

N° Ordre : 2866  
de la thèse

## **THESE**

Présentée

**DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Pour obtenir

le grade : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

**Mention :** *Chimie*

PAR

**Julie KEIRSSE**

Equipe d'accueil : *Laboratoire Verres et Céramiques UMR 6512*

*Campus de Beaulieu-Rennes*

Ecole Doctorale : *Science de la Matière*

Composante universitaire : *Structures et Propriétés de la Matière*

---

**SPECTROSCOPIE INFRAROUGE DÉPORTÉE :  
MISE AU POINT D'UN BIOCAPTEUR  
POUR L'IMAGERIE MÉTABOLIQUE ET LA SÉCURITÉ MICROBIOLOGIQUE**

---

SOUTENUE LE 10 Juillet 2003 devant la commission d'examen

### **COMPOSITION DU JURY :**

P. VIGNY	Professeur, CNRS Orléans	Président
M. MANFAIT	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
A. DESBOIS	Directeur de recherche, CEA /Saclay	Rapporteur
J.L. ADAM	Directeur de recherche, Université de Rennes 1	Examineur
O. SIRE	Professeur, Université de Bretagne-Sud	Examineur
B. BUREAU	Maître de conférences, Université de Rennes 1	Examineur



## Remerciements....

J'adresse tous mes remerciements au Professeur Jacques Lucas pour m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire Verres et Céramiques et pour l'intérêt qu'il a témoigné pour ces travaux.

Je remercie à Dr. J.L. Adam (Laboratoire Verres et Céramiques) et Pr. O. Sire (Laboratoire de Biologie et Chimie Moléculaires, UBS), pour avoir co-dirigé ces travaux pendant ces trois années, mais également pour leur conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse au Professeur Paul Vigny toute ma reconnaissance pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour ces encouragements.

Tous mes remerciements vont également à Dr. Alain Desbois et Pr. M. Manfait, pour avoir accepté d'examiner mon travail ainsi que pour leur contribution à l'amélioration de ce manuscrit.

Je tiens à remercier la Délégation Générale pour l'Armement pour avoir choisi de financer ce projet.

Je remercie également Dr. Olivier Loréal (Unité INSERM 522, Rennes) pour sa fructueuse collaboration durant ces trois années, mais aussi pour son aide précieuse lors de la rédaction.

Je remercie tous les membres du laboratoire Verres et Céramiques en particulier Catherine Boussard et Bruno Brureau, pour leur contribution à ce travail.

Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire de Biologie et Chimie Moléculaires, et en particulier Véronique Le Tilly pour ces conseils lors de la préparation de ma soutenance et Virginie Dupont pour sa collaboration à ce travail.

Mes derniers remerciements s'adresse à mes Parents, ma sœur, ainsi que tous les membres de ma famille, pour m avoir soutenue jusqu'au bout, et pour toutes les marques d'affections qu'ils ont su me témoigner.



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
------------------------------------	----------

## ***CHAPITRE I : DU VERRE AUX FIBRES***

<b>1. Introduction .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Les verres TAS .....</b>	<b>7</b>
2.1 Choix de la composition .....	7
2.2 Synthèse des verres TAS .....	9
2.2.1 Purification des éléments .....	9
2.2.2 Distillation .....	10
2.2.3 Homogénéisation et recuit .....	11
2.3 Caractéristiques physiques et optiques des verres TAS .....	12
<b>3. Fibrage et mise en forme du capteur .....</b>	<b>12</b>
3.1 Fibrage des verres TAS .....	12
3.2 Les fibres effilées .....	14
3.3 Mesure d'atténuation .....	14
3.3.1 Principe .....	14
3.3.2 Spectre d'atténuation d'une fibre en verre TAS ....	15
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>16</b>
<b>Références .....</b>	<b>17</b>

## ***CHAPITRE II : LA SPECTROSCOPIE IR ET SES APPLICATIONS EN BIOLOGIE***

<b>1. Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Spectroscopie infrarouge .....</b>	<b>20</b>
2.1 Principe .....	20
2.2 Interprétation d'un spectre moyen infrarouge .....	22
2.3 Application à la biologie .....	23
<b>3. Des fibres effilées en tant que capteur .....</b>	<b>25</b>
3.1 Principe de la réflexion totale interne .....	25
3.2 Les ondes évanescentes .....	27
3.2.1 Cas d'une fibre « classique » .....	27
3.2.2 Cas des fibres effilées .....	28

3.3 Montage et principe de la mesure .....	29
3.4 Reproductibilité des mesures .....	30
3.5 Spécificité de la spectroscopie IR par fibre optique .....	31
3.5.1 Distorsion du spectre .....	31
3.5.2 Paramètres influençant l'absorbance .....	32
3.5.3 Hydrophobie de la fibre en verre TAS .....	32
3.6 Biocompatibilité .....	33
3.6.1 Des fibres toxiques ? .....	33
3.6.2 Interaction fibre/Protéines .....	34
<b>4 Méthodes d'acquisition IR .....</b>	<b>35</b>
4.1 Transmission .....	36
4.2 ATR horizontal en ZnSe .....	36
4.3 Microscopie ATR avec cristal Ge .....	37
4.4 Fibre optique en verre TAS .....	37
<b>5 Traitements des données spectrales .....</b>	<b>37</b>
5.1 Dérivées secondes .....	37
5.2 Analyse en Composantes Principales .....	38
<b>6 Conclusion .....</b>	<b>39</b>
<b>Références .....</b>	<b>40</b>

### ***CHAPITRE III : APPLICATION EN BIOLOGIE : ANALYSE D'UN TISSU***

<b>1. Introduction .....</b>	<b>43</b>
<b>2. Principe de l'expérience .....</b>	<b>44</b>
2.1 Prélèvements hépatiques .....	44
2.2 Analyse IR par fibre optique .....	45
2.3 Analyse IR en transmission .....	46
2.4 Analyses histochimiques des échantillons .....	46
<b>3. Etude des foies de souris obèses .....</b>	<b>47</b>
3.1 Les souris obèses .....	47
3.2 Mode opératoire .....	47
3.3 Analyse des échantillons .....	48
3.4 Discussion .....	52
<b>4. Conséquences d'un jeûne sur les constituants cellulaires du foie .....</b>	<b>52</b>
4.1 Influence de la durée du jeûne sur le métabolisme hépatique .....	53

4.1.1 Mode opératoire .....	53
4.1.2 Analyse des échantillons .....	54
4.1.3 Métabolisme dans le foie au cours d'un jeûne .....	58
4.2 Influence du fond génétique face à un jeûne de 12h .....	60
4.3 Conclusion sur l'étude des conséquences d'un jeûne .....	51
<b>5. Etude de la surcharge en fer hépatique .....</b>	<b>62</b>
5.1 La surcharge en fer .....	62
5.2 Mode opératoire .....	62
5.3 Analyse des échantillons .....	63
5.4 Discussion .....	64
<b>6. Conclusion .....</b>	<b>65</b>
<b>Références .....</b>	<b>66</b>

#### ***CHAPITRE IV : APPLICATION EN BIOLOGIE : ANALYSE D'UN FLUIDE***

<b>1. Introduction .....</b>	<b>69</b>
<b>2. Prélèvements et analyses biochimiques des échantillons .....</b>	<b>70</b>
<b>3. Spectroscopie en milieu liquide .....</b>	<b>71</b>
<b>4. Introduction d'un étalon interne .....</b>	<b>72</b>
4.1 Choix de l'étalon .....	72
4.2 Mise au point du protocole expérimental .....	73
4.3 Première approche : intérêt de la normalisation .....	75
4.4 Les souris obèses .....	76
4.4.1 Analyse des résultats .....	76
4.4.2 Discussion .....	78
4.5 Conséquences d'un jeûne .....	78
4.5.1 Analyse des résultats .....	79
4.5.2 Discussion .....	81
4.6 La surcharge en fer .....	81
4.6.1 Analyse des résultats .....	81
4.6.2 Discussion .....	83
4.7 Conclusion sur l'utilisation d'un étalon interne .....	83
<b>5. Analyse en Composantes Principales .....</b>	<b>84</b>
5.1 Essais préliminaires : sérum de souris obèses .....	85
5.2 Essais sur sérum humain .....	87

5.2.1	La cirrhose alcoolique .....	89
5.2.2	L'hémochromatose génétique .....	90
5.2.3	L'hépatosidérose dysmétabolique .....	91
5.2.4	Reconnaissance non supervisée d'une pathologie particulière .....	92
5.3	Conclusion sur l'ACP .....	93
<b>6</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>94</b>
	<b>Références .....</b>	<b>95</b>
 <b>CHAPTRE V : APPLICATION EN MICROBIOLOGIE : SUIVI D'UN BIOFILM</b>		
<b>BACTERIEN</b>		
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>97</b>
<b>2.</b>	<b>Les biofilms bactériens .....</b>	<b>98</b>
<b>3.</b>	<b><i>Proteus mirabilis</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>4.</b>	<b>Détection d'une contamination de surface .....</b>	<b>101</b>
4.1	Mode opératoire .....	102
4.2	Analyse des résultats .....	102
4.3	Discussion .....	104
<b>5.</b>	<b>Cartographie IR des phénotypes de <i>P. mirabilis</i> au sein d'un biofilm .....</b>	<b>105</b>
5.1	Enregistrement des banques de spectres références .....	105
5.2	Sélection des régions spectrales pour l'ACP .....	105
5.3	ACP sur les deux banques de spectres références .....	107
5.4	Distribution spatiale des phénotypes .....	108
5.5	Discussion .....	110
<b>6.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>111</b>
	<b>Références .....</b>	<b>112</b>
 <b>CONCLUSION GENERALE .....</b>		<b>115</b>
 <b>Annexe : Les spectromètres IR à transformée de Fourier .....</b>		<b>119</b>
 <b>Publications .....</b>		<b>123</b>



**INTRODUCTION**

**GÉNÉRALE**

## *Introduction Générale*

La région visible du spectre de la lumière solaire ne représente qu'une petite partie du spectre total. Il existe, en effet, d'autres régions invisibles pour l'œil humain, caractérisées par des longueurs d'ondes différentes. Tous ces rayonnements interagissent avec la matière.

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel. Ces radiations situées au-delà de celle du rouge, sont situées entre la région du spectre visible (400 à 900 nm) et des ondes hertziennes ( $10^{10}$  à  $10^{11}$  nm), assurant ainsi la continuité du spectre des radiations électromagnétiques. Très tôt, on s'est aperçu que les fréquences du rayonnement infrarouge coïncidaient avec celles des vibrations entre atomes à l'intérieur d'une molécule. Dès 1924, l'interaction entre le rayonnement IR et les mouvements internes de la molécule, est mise en évidence.

La spectroscopie IR trouve aujourd'hui des applications dans de nombreux domaines : l'agro-alimentaire, la médecine, l'environnement, la biologie, la microbiologie, la chimie.... En effet, la plupart des molécules organiques possèdent une signature caractéristique dans ce domaine spectral. En microbiologie, la spectroscopie moyen infrarouge (MIR) permet l'identification et la classification (taxonomie) d'espèces bactériennes [1]. Cette technique permet également de détecter des composés intracellulaires [2], de suivre la production d'exoproduits en réponse à des variations environnementales [3], des interactions cellule/médicament...[4]. En biologie, la spectroscopie MIR est utilisée pour l'analyse de fluides biologiques (sérum, sang, urine, salive...) et de tissus [5 ;6]. Les analyses sur fluides ont pour but principal, la mise au point de méthodes quantitatives [5-8]. Cependant, ces analyses sont réalisées à partir de fluides biologiques déshydratés (film). Les études sur tissus ont pour objectif des analyses qualitatives et semi-quantitatives. L'analyse des spectres donne des informations sur la composition et les variations structurales des biomolécules du tissu analysé et permet ainsi, par exemple, la détection de cellules cancéreuses [8 ;9]. Les méthodes actuelles d'analyses spectroscopiques ne permettent que des études à partir de biopsies. Toutes ces analyses sont réalisées généralement avec des méthodes classiques de spectroscopie IR (Microscopie, banc ATR, transmission).

La spectroscopie Raman, autre spectroscopie vibrationnelle, est également très utilisée dans le domaine biomédical et de la microbiologie [10]. Tout comme la spectroscopie IR, cette technique donne des informations sur la composition chimique, la structure moléculaire et les interactions moléculaires d'une cellule ou d'un tissu. De même, il est possible, par exemple, de détecter des cellules cancéreuses [11] ou d'identifier des micro-organismes [12].

Une fibre optique est un matériau transparent, permettant de transporter de la lumière, tel que le rayonnement IR. Bien plus qu'un simple brin de verre, c'est un outil aux multiples applications. En effet, outre le domaine des télécommunications, la fibre optique est également grandement utilisée en médecine. La première application fructueuse de la fibre optique eut lieu au début des années 1950, lorsque le fibroscope flexible fut inventé par Van Heel et Hopkins. Cet appareil permettait la transmission d'une image le long d'une fibre en verre. Depuis, l'endoscopie est très souvent utilisée pour explorer l'intérieur du corps humain. Cet appareil permet des interventions moins complexes, moins dangereuses et moins invasives que la chirurgie traditionnelle. De plus, l'endoscopie ne nécessite, le plus souvent, qu'une anesthésie locale, le patient peut donc subir l'intervention et retourner chez lui dans la même journée. La fibre optique facilite donc le travail des professionnels de la santé ainsi que la vie de leurs patients.

Depuis plusieurs années maintenant, les fibres optiques tendent à être utilisées non plus comme transporteur de lumière mais également comme capteur d'informations. Ces senseurs à base de fibres optiques permettent la caractérisation d'échantillons *in situ*, par analyse déportée. Ils laissent ainsi envisager la mise au point d'une instrumentation non invasive, capable d'effectuer rapidement une mesure spectrale de n'importe quel échantillon.

A l'heure actuelle, la plupart des fibres optiques utilisées en spectroscopie déportée sont en silice [13 ;14] et en verres de fluorure [15], ces dernières étant beaucoup moins utilisées. Cependant, ces fibres présentent une absorption multi-phonon au delà de 3 et 4  $\mu\text{m}$  [16] respectivement, et ne sont donc pas appropriées pour l'étude d'échantillons absorbant au delà de 4  $\mu\text{m}$  [17].

Les fibres possédant une large fenêtre de transmission dans le MIR, et permettant l'analyse de composés organiques, sont de deux types : les fibres polycristallines à base d'halogénures d'argent, et celles en verre de chalcogénures. Actuellement, les fibres en

halogénures d'argent sont utilisées principalement par des groupes de chercheurs allemands (Laser-und Medizin-Technologie, Berlin) et israéliens (School of Physics and Astronomy, Tel Aviv) [18-20]. Ils utilisent des techniques de réflexion totale atténuée (ATR) et de réflexion diffuse, afin de développer, notamment, des méthodes de détection rapide de tissus humains cancéreux [21]. Ces fibres ont un domaine de transparence s'étendant jusqu'à 20  $\mu\text{m}$ . Cependant, elles sont obtenues par extrusion et leur surface est souvent rugueuse ce qui entraîne des pertes par diffusion. De plus, les propriétés mécaniques et optiques de ces fibres se dégradent rapidement en présence d'humidité et sous irradiation UV. La tendance des protéines à se dénaturer à leur contact constitue un autre désavantage [22].

Mise à part le Laboratoire Verres et Céramiques (LVC), une équipe américaine (Naval Research Laboratory ) développe également des fibres optiques en verre de chalcogénures [23]. Leur application se situe principalement dans le domaine militaire.

Le LVC a donc mis au point une fibre optique en verre de chalcogénures, transparente dans un large domaine du moyen infrarouge (MIR). Cette large fenêtre de transparence, tout à fait adaptée à l'étude des molécules organiques, a permis d'envisager l'utilisation de cette fibre pour des études en biologie. En effet, les molécules biologiques possèdent, au travers de leurs groupements fonctionnels, des signatures IR très riches dans le domaine spectral allant de 3 à 12  $\mu\text{m}$ .

C'est pourquoi les travaux de cette thèse se sont portés sur la caractérisation de cet instrumentation inédite et originale à base de fibre optique en verre de chalcogénures, permettant des études par spectroscopie infrarouge déportée. Ce biocapteur a été testé sur des systèmes biologiques complexes, en collaboration avec l'Unité 522 de l'INSERM de Rennes et le Laboratoire de Biologie et Chimie Moléculaires de l'Université de Bretagne-Sud.

Les fibres optiques sont obtenues par fibrage d'un barreau de verre transparent dans l'infrarouge. La composition vitreuse sélectionnée pour l'élaboration de ces fibres appartient à la famille des verres de chalcogénures TAS (Te-As-Se). Ainsi, dans un premier chapitre, la synthèse et les caractéristiques du verre sélectionné seront décrites. Puis, la mise en forme du capteur sera exposée.

Dans un second chapitre, le principe de la spectroscopie IR sera rappelé. Puis, nous verrons comment la fibre optique peut être utilisée comme senseur pour l'étude de systèmes biologiques complexes, ainsi que la spécificité de la spectroscopie IR par fibre optique.

Pour caractériser ce biocapteur, nous avons abordé trois applications. Tout d'abord, nous avons cherché à caractériser spectralement des anomalies métaboliques d'un tissu biologique : le foie. Ces études ont été réalisées sur des modèles animaux murins. Le foie joue un rôle majeur dans les grands métabolismes et peut donc être le siège de nombreux dérèglements métaboliques. Ainsi, nous avons cherché à caractériser des modifications du métabolisme hépatique lié à un état physiologique (le jeûne) ou pathologique (diabète avec hyperlipidémie et surcharge en fer).

Ce biocapteur a également été testé pour l'étude d'un fluide biologique : le sérum. Deux méthodes d'analyses ont été expérimentées. L'une visant à réaliser des études quantitatives en introduisant, dans les échantillons de sérum, un étalon interne de concentration connue. L'autre méthode d'analyse concerne une analyse rapide des spectres et non supervisée, en s'affranchissant notamment des problèmes liés à la forte teneur en eau du milieu analysé : l'Analyse en Composantes Principales (ACP). Ces analyses ont été réalisées sur sérums humains et animaux.

La dernière partie de ce travail a concerné des applications en microbiologie. En collaboration avec le Laboratoire de Chimie et Biologie Moléculaires, le développement d'un biofilm bactérien a été suivi *in situ* et en temps réel. Ces études constituent un enjeu majeur dans le traitement d'infections, le contrôle de matériel médical (cathéters) ou l'étude de résistances acquises aux antibiotiques. Nous verrons également comment ce biocapteur permet de distinguer spectralement les phénotypes en présence lors de processus de différenciation.

## RÉFÉRENCES

- [1] D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, D. Nauman, *Journal of General Microbiology* (1991), 137, 69-79.
- [2] D. Naumann, C.P Shultz, D. Helm, « *What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacteria cells ?* », In : *Infrared spectroscopy of Biomolécules*, H.H Mantsch and D. Chapman eds., , Wiley-Liss, Inc., New-York, (1996) 279-310.
- [3] D. Naumann, *Infrared Spectroscopy in Microbiology*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons LTD., Chichester, (2000), 102-131.
- [4] W. Bouhedja, G.D. Sockalingum, P. Pina, P. Allouch, C. Bloy, R. Labia, J.M. Millot, M. Manfait, *FEBS Letters*, (1997), 412, 39-42
- [5] S. Low-Ying, R.A Shaw, M. Leroux, H.H Mantsch, *Vibrational Spectroscopy*, (2002), 28 111-116.
- [6] D.C Malins, N.L. Polisar, K. Nishikida, E.H. Holmes, H.S. Gardner, S.J. Gunselman, *Cancer*, (1995), January 15, Vol. 75, No.2, 503-517.
- [7] W. Petrich, A. Staib, M. Otto, R.L. Somorjai, *Vibrational Spectroscopy*, (2002), 28 117-129.
- [8] C. Petibois, G. Cazola, G. Deleris, *Int. J. Sports Med.*, (2003), Jan, 24, (1), 36-42.
- [9] J. Ramesh, A. Salman, Z. Hammody, B. Cohen, J. Gopas, N. Grossman, S. Mordechai, *J. Biochem. Biophys. Methods*, (2001), 50, 33-42.
- [10] L.P. Choo-Smith, H.G.M. Edwards, H.P. Endtz, J.M. Kros, F. Heule, H. Barr, J.S. Robinson Jr., H.A. Bruining, G.J. Puppels, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, (2002), Vol.67, 1-9.
- [11] M. Manfait, P. Lamaze, H. Lamfarraj, M. Pluot, G.D. Sockalingum, *Diagnosis and prognosis of tissue pathologies by Raman microspectroscopy : An application to human thyroid tumors. Biomedical Spectroscopy*, Anita Mahadevan-Jansen, Gerwin J. Puppels, Editors, SPIE, (2000) 3918, 153-160.

- [12] G.D. Sockalingum, H. Lamfarraj, A. Beljebbar, P. Pina, M. Delavenne, F. Witthuhn, P.Y. Allouch, M. Manfait, *Vibrational spectroscopy as a probe to rapidly detect, identify and characterize microorganisms. Biomedical Applications of Raman Spectroscopy*, A. Katzir, Editor, SPIE, (1999), 3608, 185-194.
- [13] H. Tai, H. Tanaka, T. Yoshino, *Opt. Lett.*, (1987), 12, 437-439.
- [14] F.L. Dickert, S.K. Schreiner, G.R. Mages, H. Kimmel, *Anal. Chem.*, (1989), 61, 2306-2309.
- [15] S.J. Saggese, M.R. Shahriaru, G.H. Sigel Jr., *Infrared Optical Material IV*, S. Musikant, ed., Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., (1998), 929, 106-114.
- [16] J.R. Gramon, *Materials for mid-infrared waveguides*, in *Infrared Fibers (0,8-12  $\mu$ m) I*, L.G DeShazer and C. Kao, eds., Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., (1981), 266, 62-68.
- [17] J. Heo, M. Rodrigues, S.J. Saggese, G.H. Sigel Jr., *Appl. Opt.*, (1991), 30, 3944-3951.
- [18] M. Katz, A. Katzir, I. Schnitzer, A. Bornstein, *Applied Optics*, (1994), 1 sept., Vol.33, No. 25, 5888-5894.
- [19] M. Jakush, B. Mizaikoff, R. Kellner, A. Katzir, *Sensors and actuators B*, (1997), 38-39, 83-87.
- [20] B. Mizaikoff, R. Gobel, R. Krska, K. Taga, R. Kellner, M. Tcke, A. Katzir, *Sensors and actuators B*, (1995), 29, 58-63.
- [21] H. Winter, U. Binding, W. Wasche, K. Liebold, A. Roggan, P. Frege, U.M. Gross, G. Muller, *proc. SPIE*, Vol. 3596, 197-209.
- [22] U. Binding, M. Meinke, I. Gersonde, O. Spectror, I. Vasserman, A. Katzir, G. Müller, *Sensors and actuators B*, (2001), 74, 37-46.
- [23] J.S. Sanghera, F.H. Kung, P.C. Pureza, V.Q. Nguyen, R.E. Miklos, I.D. Aggarwal, *Applied Optics*, (1994), 20 sept., Vol.33, No. 27, 6315-6322.

# CHAPITRE I

## DU VERRE AUX FIBRES



## 1. Introduction

La fabrication de fibres optiques permettant de guider la lumière est une opération complexe qui passe par plusieurs étapes, dont la première est la synthèse d'un verre. L'état vitreux est une forme particulière de l'état solide, caractérisé par une absence de cristallisation.

Parmi les différentes familles, les verres de chalcogénures ont la particularité d'avoir une très large fenêtre de transmission dans l'infrarouge. Outre le soufre, le sélénium et le tellure, ces verres sont constitués d'éléments lourds, tels que le germanium, l'arsenic, l'antimoine ou l'iode, qui repoussent la transmission multiphonon vers les grandes longueurs d'onde.

Pour nos études, nous avons choisi une composition de verre de chalcogénures appartenant au système ternaire tellure/arsenic/sélénium, référencé sous l'acronyme **TAS**. La composition retenue,  $\text{Te}_2\text{As}_3\text{Se}_5$ , est stable chimiquement et possède une large fenêtre de transmission dans le moyen infrarouge. De plus, ses propriétés thermomécaniques rendent ce verre apte au fibrage.

Ce premier chapitre développe les différentes étapes nécessaires à la synthèse d'une telle composition vitreuse, ainsi que celles qui permettent de passer du verre aux fibres.

## 2. Les verres TAS

### 2.1 Choix de la composition

La recherche d'une composition vitreuse à partir des éléments tellure/arsenic/sélénium passe par l'étude du diagramme ternaire de ces trois éléments. Dans l'optique de synthétiser des fibres à partir de la composition vitreuse, le critère de choix est un compromis entre :

- Un large domaine de transmission dans l'infrarouge
- Une grande stabilité vis-à-vis de l'environnement (eau, air, acide...)
- Une température de transition vitreuse pas trop élevée

- Une grande résistance thermique vis-à-vis de la cristallisation
- Un minimum de pertes optiques
- De bonnes propriétés mécaniques (flexibilité, résistance à la traction)

La figure 1 représente le diagramme ternaire du système vitreux, tellure/arsenic/sélénium [1]. L'analyse de ce diagramme ternaire montre un large domaine vitreux comprenant deux parties.

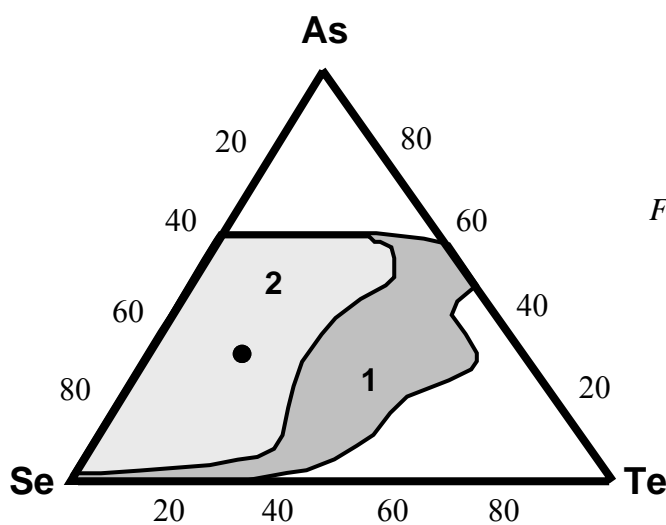


Fig. 1 : Diagramme ternaire du système tellure/arsenic/sélénium.

● Composition choisie :  $Te_2As_3Se_5$

Dans la zone 1, les compositions vitreuses ont une tendance à cristalliser alors que dans la zone 2, elles sont stables vis-à-vis de la cristallisation. La composition retenue pour optimiser la fabrication de fibres optiques transparentes dans l'infrarouge est  $Te_2As_3Se_5$ . Les caractéristiques de chacun de ces 3 éléments, ont permis d'orienter les recherches vers cette composition.

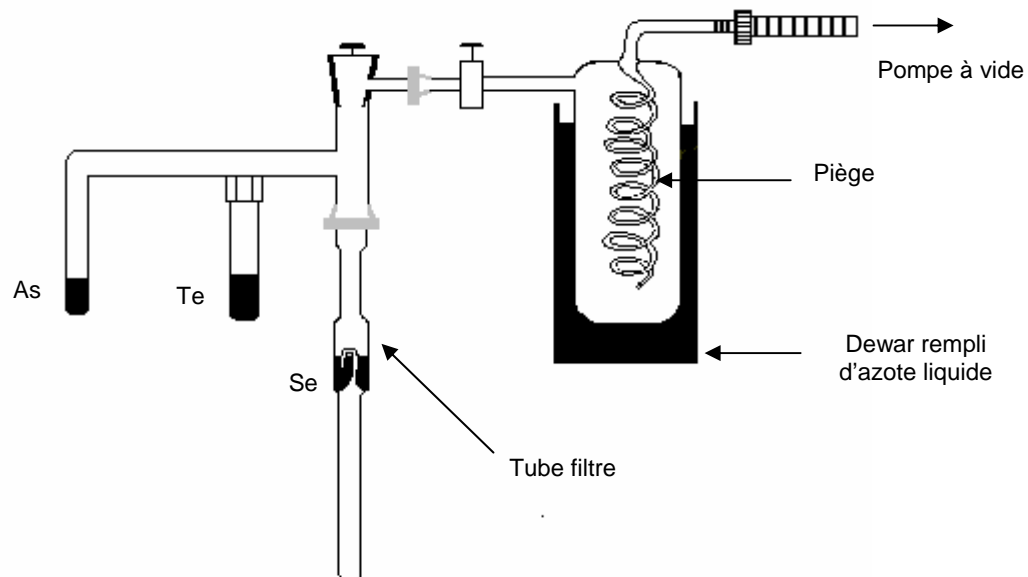
Le **sélénium** favorise la vitrification par rapport à la cristallisation [3]. C'est pourquoi, il représente l'élément le plus abondant dans la composition choisie. Rappelons que le sélénium existe à l'état vitreux.

Le **tellure** est un élément plus lourd qui permet d'abaisser la fréquence de vibration. Cependant, lorsque la teneur en Te dépasse 30 %, le verre a tendance à cristalliser. Dans les verres TAS, il repousse la fenêtre de transmission jusqu'à 18  $\mu m$ .

L'**arsenic** stabilise la structure vitreuse et améliore les propriétés thermiques. C'est un élément trivalent qui réticule les chaînes de sélénium et de tellure. La rigidité de la structure vitreuse est ainsi plus grande, et la température de transition vitreuse augmente [2].

## 2.2 Synthèse des verres TAS

La synthèse des verres TAS est réalisée sous vide à l'aide d'un montage réactionnel en pyrex et d'un tube filtre en silice (Fig. 2) spécialement conçu pour cet usage [4].



*Fig. 2 : Montage réactionnel utilisé pour la synthèse des verres TAS*

La synthèse se déroule en plusieurs étapes et une semaine est nécessaire pour l'obtention d'un barreau de verre prêt à être fibré.

### 2.2.1 Purification des éléments

Les propriétés optiques d'un verre sont très sensibles à la présence d'impuretés. C'est pourquoi la synthèse débute toujours par le nettoyage intensif du montage réactionnel par une

solution d'eau régale (1/2  $\text{HNO}_3$ , 2/3  $\text{HCl}$ ). Il est ensuite rincé et séché à l'alcool puis placé sous vide pendant plusieurs heures. De même, la synthèse doit s'effectuer avec des éléments de haute pureté (5N). Cependant, au contact de l'air, il se forme toujours en surface, une couche d'oxydes qu'il faut éliminer [5]. Ainsi, malgré le haut degré de pureté de départ des éléments (99,999 %), l'étape de purification reste indispensable pour obtenir une bonne transmission du verre.

Le **tellure** est purifié avant son introduction dans le montage. Il est recouvert par une solution d'acide bromhydrique et de brome pendant 5 à 10 min., selon le degré de contamination. Puis, il est rincé à l'alcool absolu, et introduit dans le montage réactionnel tiré sous vide pour éliminer l'alcool.

Le **sélénium** est purifié sous vide dans le montage réactionnel par chauffage à 235 °C pendant 2 h. A cette température, le sélénium fond. Par contre, les oxydes de sélénium ( $\text{SeO}_2$ ) s'échappent car ils ont une pression de vapeur plus grande que celle du sélénium.

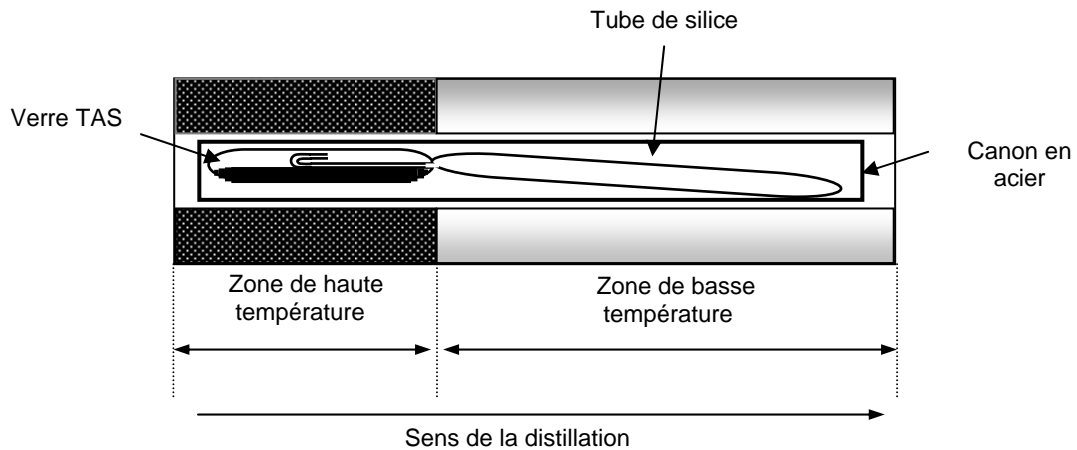
L'**arsenic** est purifié sous vide à 285 °C pendant 2 h. L'arsenic ne fond pas à cette température mais l'oxyde d'arsenic ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) qui présente également une pression de vapeur élevée, est éliminé.

Cette étape terminée, les trois éléments purifiés sont rassemblés dans le tube filtre qui sera détaché du reste du montage par scellage.

### 2.2.2 Distillation

La distillation permet l'élimination des impuretés qui ont une température d'ébullition supérieure à celle des éléments. Ces impuretés, autres que l'oxygène, altèrent la transmission du verre en diffusant la lumière. Le tube contenant les éléments purifiés, est placé dans un four à distiller (Fig. 3) comprenant une zone de haute température ( 880 °C ) et une zone de plus basse température.

Le tube filtre est placé au niveau de la zone chaude. Pendant la distillation, le verre sublimé se condense dans la zone froide du tube, qui sera scellée une fois cette opération terminée.



*Fig. 3 : Représentation schématique de la distillation d'un verre TAS dans son ampoule réactionnelle en silice.*

### 2.2.3 Homogénéisation et recuit

Le tube scellé, contenant le verre sublimé, est placé dans un four basculant pour homogénéiser le bain fondu et obtenir un barreau de verre. Cette opération doit durer au moins 24 h à 650 °C. Puis, la trempe est réalisée rapidement dans l'eau à température ambiante, ce qui permet de décoller plus facilement le barreau de verre du tube de silice.

Ensuite, le barreau est recuit pendant 6 h à une température (132 °C) proche de la température de transition vitreuse pour limiter les contraintes mécaniques dues à la trempe. On obtient ainsi pour une masse de 30 g de verre, un barreau (Fig. 4), de 1 cm de diamètre et de 10 cm de longueur.



*Fig. 4 : Barreau de verre TAS obtenu en fin de synthèse.*

Pour améliorer l'état de surface, le barreau est poli mécaniquement.

### 2.3 Caractéristiques physiques et optiques des verres TAS

Les verres TAS sont très stables. Ils ne cristallisent pas dans des conditions normales de montée en température. Ces principales caractéristiques ont été déterminées par de précédents travaux [6]. Elles sont rassemblées dans le tableau ci-dessous :

Indice de réfraction	$n = 2,8$
Température de transition vitreuse	$T_g = 137\text{ °C}$
Coefficient de dilatation	$230 \cdot 10^{-7}\text{ K}^{-1}$
Domaine de transmission	2 à 18 $\mu\text{m}$

*Tableau I : Principales caractéristiques physiques du verre TAS.*

## 3. Fibrage et mise en forme du capteur

### 3.1 Fibrage des verres TAS

La tour utilisée pour la réalisation des fibres est schématisée sur la figure 5. Le fibrage des verres TAS a été réalisé en utilisant la méthode de la préforme. Cette technique a été choisie car la température de fibrage de ces verres est basse. Cette température dépend de la composition du verre. Pour les verres TAS, elle est fixée expérimentalement à 250 °C, soit environ 110 °C au-dessus de la température de transition vitreuse du verre. La technique consiste à étirer par chauffage le barreau de verre pour former une fibre.

Le barreau de verre est fixé au sommet de la tour dans une enceinte balayée par un courant d'hélium. Ce gaz inerte permet d'éliminer toutes traces d'impuretés et évite toute cristallisation de surface due à l'humidité. De plus, l'hélium possède une bonne conductivité thermique ce qui permet d'homogénéiser la température autour du barreau.

L'extrémité du barreau est chauffée à 250°C, à l'aide d'un four annulaire. La température du four doit être parfaitement contrôlée afin d'éviter toutes variations du diamètre

de la fibre. Sous l'effet de la chaleur, le verre se ramollit et forme une goutte qui tombe sous l'action de son poids. La fibre ainsi créée est étirée jusqu'au tambour en rotation où elle y est fixée. Le diamètre de la fibre varie en agissant sur la vitesse de rotation du tambour et/ou la vitesse de descente de préforme. Le diamètre est contrôlé pendant toute la durée du fibrage grâce à un système optique placé en ligne, le mesureur de diamètre.

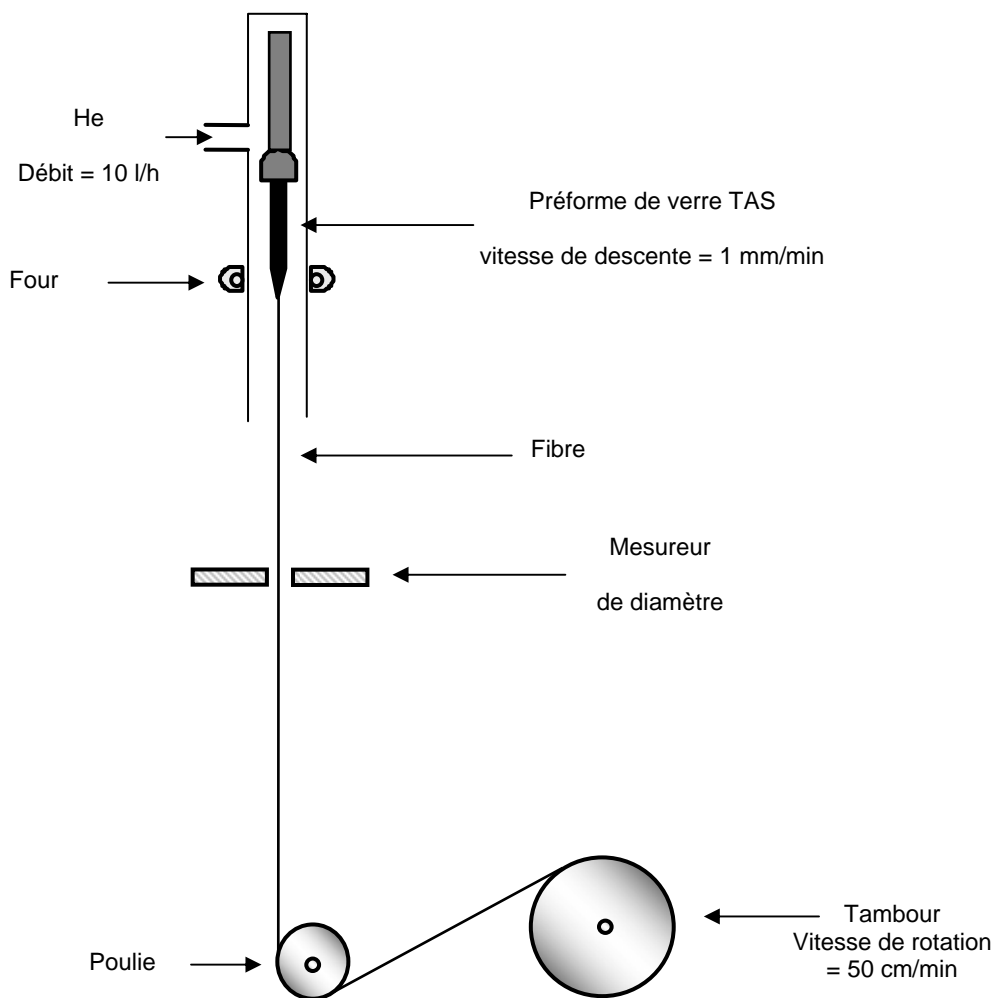


Fig. 5 : Représentation schématique de la tour utilisée pour le fibrage des verres TAS.

### 3.2 Les fibres effilées

Les fibres utilisées pour nos études, sont des fibres dites effilées. Le diamètre de la fibre est fortement diminué sur quelques centimètres. L'intérêt de cette configuration particulière de fibre sera discuté dans le chapitre II.

Les fibres effilées sont normalement obtenues par changement de vitesse de rotation du tambour et/ou de vitesse de descente de préforme. Cependant, cette technique n'a pu être utilisée car les temps de réponse sont trop lents et il n'est pas encore possible d'obtenir un effilement de la fibre sur quelques centimètres. La méthode employée consiste donc à tirer sur la fibre manuellement, au cours du fibrage. Avec les paramètres de fibrage appliqués, les fibres obtenues ont un profil de diamètre de 450-100-450  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Mesure d'atténuation

#### 3.3.1 Principe

L'atténuation provient principalement de :

- l'absorption due aux transitions électroniques intrinsèques
- la diffusion de la lumière
- l'absorption dues aux impuretés
- l'absorption multi-phonon de la matrice

Le spectre d'atténuation est enregistré sur la région spectrale de transparence de la fibre optique en utilisant la méthode dite du « cut-back ». Le dispositif utilisé comprend un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier BRUKER V22 couplé à un détecteur Hg-Cd-Te (MCT) refroidi à l'azote liquide.

La mesure consiste à mesurer l'intensité de lumière  $I_1$  à la sortie de la fibre de longueur  $L_1$ . La mesure est réitérée sur la même fibre mais raccourcie d'environ 1 mètre. On enregistre alors une intensité  $I_2$  sur une longueur de fibre  $L_2$ , sans modifier les conditions d'injection à l'entrée de la fibre. Pour chaque longueur d'onde  $\lambda$ , l'atténuation  $\alpha$  de la fibre exprimée en dB/m, est calculée selon l'expression I-1 [7].



$$\alpha = \frac{10}{\Delta L} \text{Log} \frac{I_2}{I_1} \quad (\text{I-1}) \quad \text{avec} \quad \Delta L = L_1 - L_2$$

Les enregistrements ont été réalisés avec une résolution spectrale de 4 cm<sup>-1</sup> et une co-addition de 100 scans.

### 3.3.2 Spectre d'atténuation d'une fibre en verre TAS

La figure 6 représente le spectre d'atténuation d'une fibre mono-indice en verre TAS pour un diamètre de 450 µm et une différence de longueur  $\Delta L = 1,06$  m. Chaque extrémité de la fibre a été soigneusement clivée avec une lame coupante en diamant.

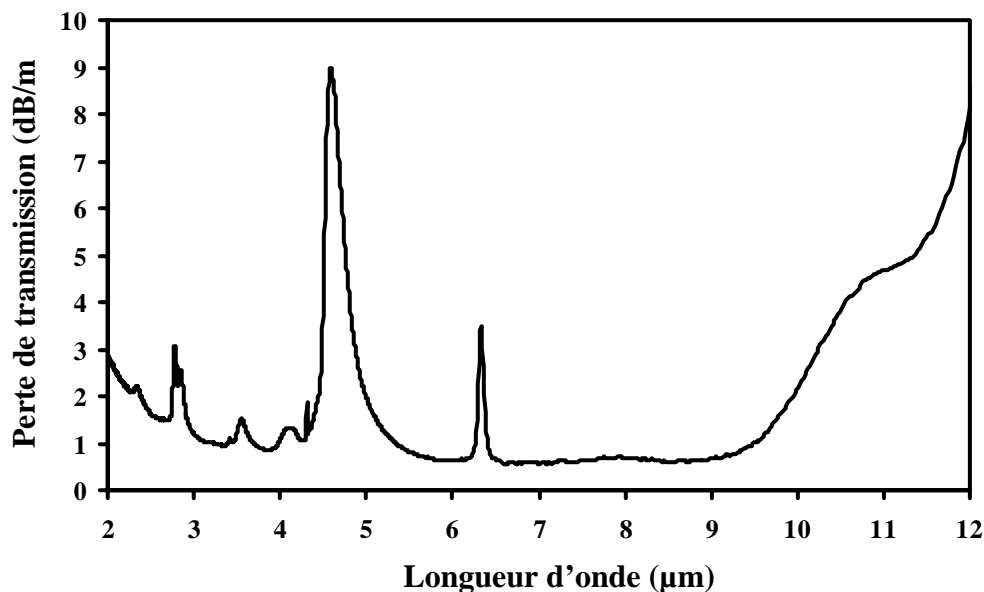


Fig. 6 : Spectre d'atténuation d'une fibre mono-indice en verre TAS .

Le spectre indique un domaine de transparence de la fibre en verre TAS allant de 2 à 12 µm. Le minimum des pertes optiques observé entre 6,5 et 9,5 µm, est inférieur à 1 dB/m.

L'attribution des bandes est rassemblée dans le tableau II [8-10]. Le pic à 4,31 µm est attribué au CO<sub>2</sub> atmosphérique. L'épaule observée à 11 µm est quant à lui attribué à des résidus d'oxydes.

Longueur d'onde ( $\mu\text{m}$ )	Attribution
2,28	Se-H (1 <sup>ère</sup> Harmonique)
2,80	O-H (élongation fondamentale )
3,54 4,13	Se-H ( Combinaison )
4,57	Se-H ( Fondamentale )
6,32	H-O-H ( déformation angulaire )

*Tableau II : Attributions des bandes parasites observées sur le spectre d'atténuation des fibres en verre TAS.*

Malgré tout le soin apporté durant la synthèse des verres, ces bandes parasites demeurent toujours présentes. Cependant, une double distillation diminue fortement le pic de l'eau, mais augmente fortement celui attribué à l'élongation fondamentale Se-H.

Notons qu'une forte bande à 4,57  $\mu\text{m}$  de l'élongation fondamentale Se-H, n'est pas gênante car aucune molécule d'intérêt pour nos études n'absorbe dans cette région.

#### 4. Conclusion

Les verres TAS de composition  $\text{Te}_2\text{As}_3\text{Se}_5$  permettent la mise en forme de fibres optiques transparentes dans une large fenêtre du moyen infrarouge (2-12  $\mu\text{m}$ ). Les pertes optiques sont alors inférieures à 1 dB/m dans la zone de 6,5 à 9,5  $\mu\text{m}$ .

Ces propriétés exceptionnelles de transparence optique permettent d'envisager l'utilisation des fibres comme capteur en spectroscopie infrarouge déportée. Ces fibres ont une configuration particulière. Ce sont des fibres effilées, dont la zone de plus faible diamètre servira de senseur.

## RÉFÉRENCES

- [1] Z.U. Borisova, *Glassy semiconductors*, Ed. Plenum Press, NewYork, (1981), 193.
- [2] D.D. Thornburg, *Journal of Electronics Materials*, (1973), vol. 2, N° 4.
- [3] S.S.K Titus, S. Asokan, T.K Mondal, E.S.R Gopal, *Solid State Communications*, (1994), vol. 89, N° 1, 23-26.
- [4] H.L Ma, X.H. Zhang, J. Lucas, *J. Non-Cryst. Solids*, (1991), vol. 135, 49-54.
- [5] X.H. Zang, H.L Ma, C. Blanchetière, J. Lucas, *J. Non-Cryst. Solids*, (1993), vol. 161, 327-330.
- [6] S. Hocdé, « *Fibres optiques en verre infrarouge. Applications en chimie et biologie* », Thèse, (2000), Université de Rennes I.
- [7] P.W. France, M.G. Dexhage, J.M.Parker, M.W. Moore, S.F. Carter, J.V. Wright, « *Fluoride glass optical fibers* », Ed. Blackie, Glasgow ang London, (1990).
- [8] G.G. Devyatykh, M.F. Churbanov, I.V. Scripachev, E.M. Dianov, V.G. Plotnichenko, *International Journal of Optoelectronics*, (1992), vol. 7, N° 2, 237-254.
- [9] T. Kanamori, Y. Terunuma, S. Takahashi, T. Miyashita, *J. Non-Cryst. Solids*, (1985), vol. 69, 231-242.
- [10] C.T. Moynihan, P.C. Macedo, M.S. Maklad, R.K. Morh, R.E. Howard, *J. Non-Cryst. Solids*, (1975), vol. 17, 369.

## CHAPITRE II

LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

ET

SES APPLICATIONS EN BIOLOGIE

## 1. Introduction

La spectroscopie moyen infrarouge (MIR) est une spectroscopie d'absorption. Les liaisons chimiques absorbent le rayonnement du MIR à des longueurs d'onde spécifiques dépendant de leur nature et de leur conformation. C'est ainsi que les informations données par le spectre permettent l'identification et le dosage des échantillons étudiés ainsi que l'étude des interactions entre les différents composants.

Dans une fibre optique, la lumière se propage par réflexion totale à l'interface entre le verre, d'indice de réfraction élevé ( $n = 2,8$ ), et l'air. Chaque réflexion induit un champ évanescent à la surface de la fibre, qui se propage tout le long de celle-ci, sans perte d'énergie. Par contre, une partie de cette énergie sera absorbée lorsque l'on met au contact de la fibre un corps absorbant dans le domaine infrarouge. Les molécules biologiques (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques) possèdent, au travers de leurs groupements fonctionnels, des signatures infrarouges très riches dans le domaine spectral compris entre 800 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . C'est pourquoi, les fibres optiques en verre TAS représentent un formidable champ d'investigation pour la spectroscopie IR des biomolécules.

Après avoir décrit les principes de la spectroscopie par ondes évanescentes, nous traiterons plus particulièrement les applications de la spectroscopie MIR en biologie. Nos études visant des applications dans le domaine médical, il s'est donc avéré important d'étudier également l'interaction des fibres en verre TAS avec des substances biologiques. C'est pourquoi nous aborderons la biocompatibilité de ces fibres.

Pour finir, nous comparerons cette méthode avec d'autres techniques d'acquisitions de spectres IR, et aborderons deux méthodes de traitement spectral.

## 2. Spectroscopie infrarouge

### 2.1 Principe

Le principe de la spectroscopie infrarouge a été souvent détaillé notamment par Bertrand et par Rouessac [1 ; 2]. Le rayonnement infrarouge (IR) est une radiation de nature électromagnétique, correspondant à la partie du spectre comprise entre  $12\,800\text{ cm}^{-1}$  et  $10\text{ cm}^{-1}$ . La fenêtre spectrale de l'IR, se décompose en 3 parties : le proche, le moyen et le lointain IR. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la région du moyen infrarouge (MIR), qui s'étend de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $400\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5\text{ }\mu\text{m}$  à  $25\text{ }\mu\text{m}$ ). Ce domaine correspond aux transitions moléculaires de type vibration et rotation, lesquelles conduiront à des absorptions.

Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement IR, elle peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Les liaisons chimiques qui la composent doivent être considérées comme des oscillateurs anharmoniques (Fig. 1), car une liaison n'est pas parfaitement élastique.

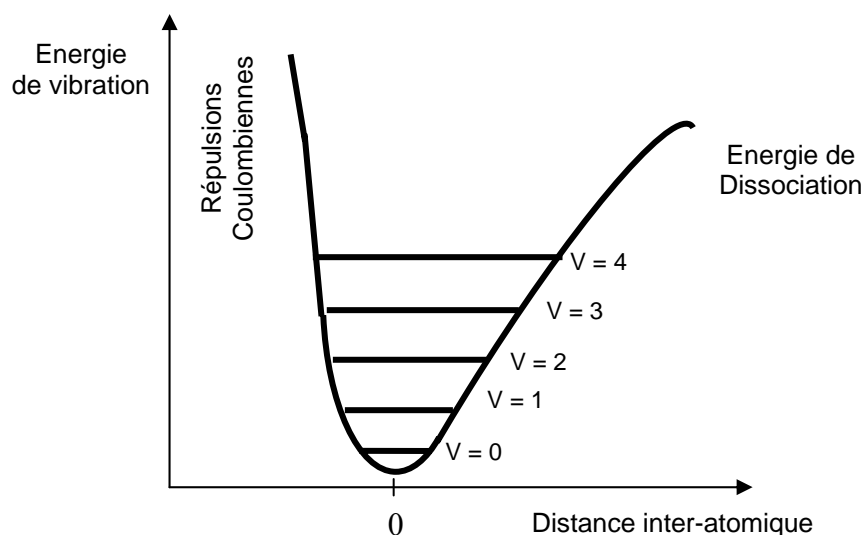


Fig. 1 : Potentiel anharmonique et niveaux d'énergie.

Si une liaison oscille à la même fréquence que la composante électrique de l'onde lumineuse IR, celle-ci pourra transmettre son énergie à la liaison. Plus précisément, un

rayonnement de fréquence donnée pourra être absorbé ce qui conduira à l'état excité, caractérisé par une amplitude de vibration plus élevée. De ce fait, l'énergie du rayonnement IR se retrouve diminué après l'interaction, conduisant à l'apparition d'une bande d'absorption à cette fréquence. L'énergie absorbée ( $\nu_0$ ) est donc caractéristique de chacune des liaisons chimiques de la molécule analysée. Notons que s'il n'y a pas de dipôle permanent, c'est-à-dire si les charges électriques sont parfaitement symétriques, il n'y aura pas de couplage possible avec l'onde électromagnétique. Il n'y aura donc aucune absorption d'énergie. Les molécules non polaires sont « transparentes » dans l'IR, on parle de transition inactive. Une transition active possède donc nécessairement un dipôle dont le module fluctue avec la distance inter-atomique.

Le spectre IR est ainsi constitué de nombreuses bandes d'absorption. Il représente pour chaque longueur d'onde  $\lambda$ , le rapport (II-1) des intensités transmises avec ( $I_{\text{éch}}$ ) et sans échantillon ( $I_0$ ).

$$T = I_{\text{éch}} / I_0 \quad (\text{II-1})$$

Ce rapport s'appelle la transmittance et :

$$A = \text{Log } 1 / T \quad (\text{II-2})$$

où A est l'absorbance. On préfère exprimer A en fonction du nombre d'onde  $\bar{\nu}$ , plutôt que de la longueur d'onde  $\lambda$ , car  $\bar{\nu}$  est directement proportionnel à une énergie d'après la relation II-3.

$$E = h \nu = \frac{h c}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad (\text{II-3})$$

avec  $h$  : constante de Planck,  $6,62.10^{-34}$  J.s

$\nu$  : fréquence

$c$  : célérité de la lumière,  $3.10^8$  m/s

Dans le MIR, tout composé organique possède une signature qui lui est propre. C'est pourquoi cette technique est très souvent utilisée pour caractériser un échantillon. L'étude des spectres permet de tirer deux types d'informations :

- *informations qualitatives* : les liaisons chimiques absorbent à une longueur d'onde caractéristique. Des tables IR permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques en présence et donc d'identifier la ou les molécules présentes.

- *informations quantitatives* : l'intensité de la bande d'absorption rend compte de la concentration du groupe chimique caractéristique de cette absorption (loi de Beer-Lambert).

## 2.2 Interprétation d'un spectre moyen infrarouge

Le spectre IR est composé de bandes d'absorption qui vont être utilisées pour déterminer la structure de la molécule étudiée ou du mélange à identifier. Les bandes d'absorption dans le MIR (800 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) résultent des modes de vibration, ceux-ci, pouvant être attribués à des groupements fonctionnels fondamentaux. L'interprétation des spectres est empirique et consiste le plus souvent, en la comparaison des résultats obtenus avec ceux de la bibliographie. Elle est basée principalement sur l'analyse des spectres IR de molécules isolées.

La position d'une bande dépend à la fois de la nature du vibreur mais aussi de son environnement. Les liaisons entre atomes légers vibrent à plus haute fréquence que les liaisons entre atomes plus lourds. Lorsque la masse réduite  $\mu$  augmente, la fréquence  $\nu$ , diminue, selon la loi de Hook (II-4).

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{II-4}) \quad \text{avec} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (\text{II-5})$$

avec  $k$  : constante de la force de liaison,

$m_1$  et  $m_2$  : masse des atomes liés.

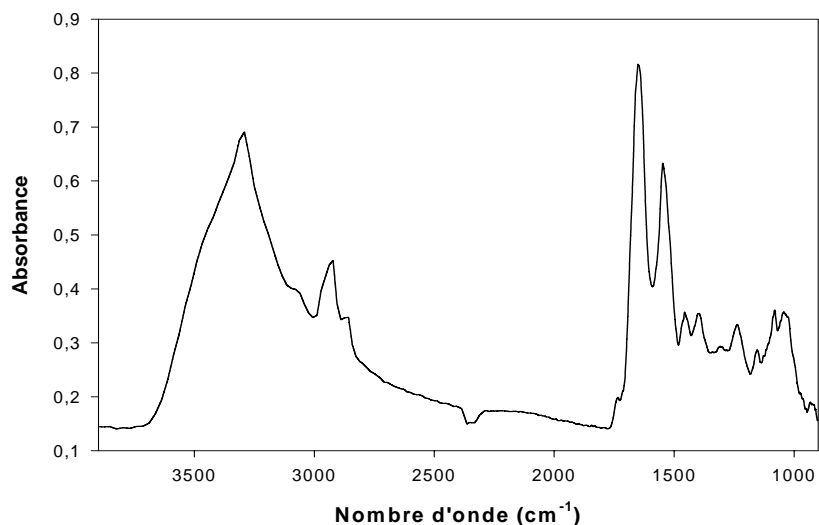
L'intensité de la bande dépend de la concentration, mais aussi de la nature et de la polarité de la liaison. De même, de nombreux facteurs externes ou internes à la molécule ont une influence sur la fréquence de vibration : taille et électronégativité des atomes environnants, liaisons hydrogène, effet stérique, conformation... Ces effets doivent être considérés comme un avantage, car ils permettent une plus grande sélectivité et donc facilitent l'identification spectrale.



### 2.3 Application à la biologie

La plupart des biomolécules possèdent une signature caractéristique dans le MIR. Les cellules, les fluides biologiques, ... contiennent de nombreuses molécules (protéines, lipides, glucides et acides nucléiques). Ces molécules ont une formule chimique complexe, se traduisant par une multitude de bandes d'absorption dans le spectre MIR.

Le spectre MIR d'un échantillon biologique consiste donc en l'addition de nombreuses bandes spectrales qui vont se chevaucher et/ou se superposer (Fig. 2) [3 ; 4]. L'analyse des spectres, dans ce cas, n'est pas simple, d'autant plus que l'environnement des molécules influence les fréquences de vibration. Néanmoins, de nombreuses bandes d'absorptions ont pu être attribuées (Tableau I) [3 ; 4]. La spectroscopie MIR est donc une technique intéressante puisqu'elle permet d'obtenir une image globale et complète d'une cellule donnée dans un état métabolique particulier.

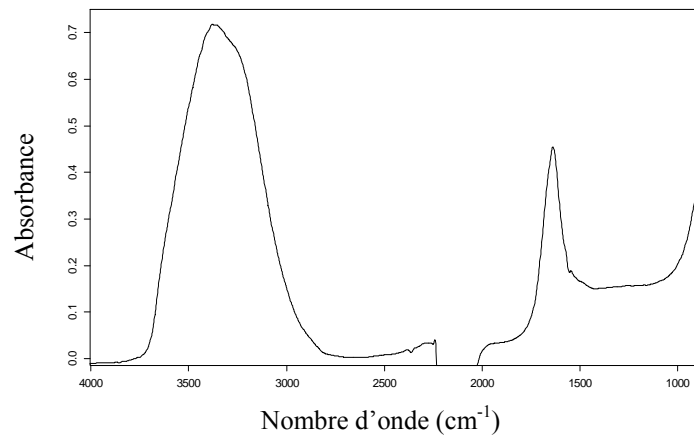


*Fig. 2 : Spectre IR d'une coupe de foie de souris.*

Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Attribution	Molécule
≈ 3500	ν OH	Groupes Hydroxyles
≈ 3200	ν NH Amide A	Protéines
3010	=C-H	Lipides
2956	ν CH <sub>3</sub> asymétrique	Lipides
2921	ν CH <sub>2</sub> asymétrique	Lipides
2870	ν CH <sub>3</sub> symétrique	Lipides
2850	ν CH <sub>2</sub> symétrique	Lipides
1742	ν C=O	Triglycérides
1738	ν C=O	Phospholipides
1695-1637	Amide I	Protéines
1636	δ OH	H <sub>2</sub> O
1550	Amide II	Protéines
1468	CH <sub>2</sub> cisaillement	Lipides
≈1400	ν C=O des fonctions COO <sup>-</sup>	Acides Gras Acides Aminés
1310-1240	Amide III	Protéines
1250-1220	ν P=O asymétrique	Phosphodiester
1100-1080	ν PO <sub>2</sub> symétrique	Phospholipides Acides nucléiques
1200-900	C-O-C C-O-P, P-O-P	Oligo- et Poly- saccharides

Tableau I : Principales bandes d'absorption caractéristiques des biomolécules ( ν : élongation, δ : déformation ).

Une des particularités des cellules vivantes, est de contenir un fort pourcentage d'eau. Le spectre MIR de l'eau pure montre que les bandes d'absorption couvrent deux larges domaines de la fenêtre spectrale du MIR (Fig. 3).



*Fig. 3 : Spectre MIR de l'eau pure, obtenu à l'aide de la fibre optique en verre TAS.*

De plus, le spectre de l'eau est dépendant de son environnement. Les molécules d'H<sub>2</sub>O interagissent avec les solutés, ce qui a une influence sur les fréquences de vibration [5 ; 6]. La contribution de l'eau sur le spectre est donc importante. Il faut en tenir compte lorsque l'on travaille sur liquide biologique ou tissu frais.

### 3. Des fibres effilées en tant que capteur

#### 3.1 Principe de la réflexion totale interne

Le principe de la réflexion totale interne est à la base de la propagation des ondes lumineuses dans une fibre optique (Fig. 4). Ce principe a été détaillé par Harrick [7].

Lorsqu'un rayon lumineux traverse une interface entre deux milieux caractérisés par des indices de réfraction différents,  $n_1$  et  $n_2$ , il est partiellement transmis et partiellement réfléchi.

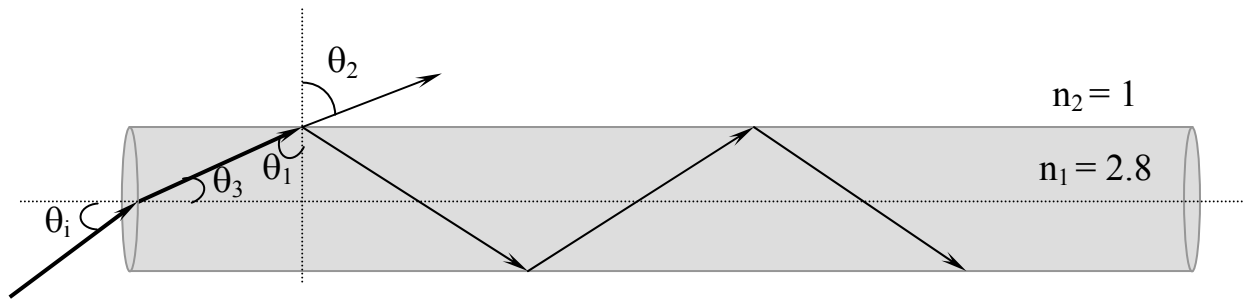


Fig. 4 : Représentation schématique de la propagation d'un rayonnement lumineux dans une fibre optique mono-indice.

L'angle du faisceau transmis est donné par la relation de Snell-Descartes (II-6), en fonction de l'angle du faisceau incident.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (\text{II-6})$$

La réflexion d'une onde est dite totale quand 100 % de l'onde est réfléchi. Elle ne peut avoir lieu que lorsque l'onde vient du milieu d'indice le plus élevé. La réflexion totale interne est régie par les indices de réfraction des deux milieux. On définit alors un angle critique  $\theta_c$  selon l'équation II-7.

$$\theta_c = \arcsin (n_2 / n_1) \quad (\text{II-7})$$

Connaissant les indices de réfraction des deux matériaux de l'interface, l'angle critique peut facilement être calculé. Dans le cas du verre TAS,  $n_1 = 2,8$  et  $n_2 = 1$  si la fibre est mise en contact de l'air, milieu pratiquement non absorbant, ce qui conduit à un angle critique,  $\theta_c = 21^\circ$ . Cela signifie que pour qu'il y ait propagation, il faut  $\theta_1 > 21^\circ$ . Par ailleurs, une onde pénètre dans la fibre optique avec un angle d'incidence  $0^\circ < \theta_i < 90^\circ$ . Par conséquent, d'après la loi de Snell-Descartes (II-6),  $0^\circ < \theta_3 < 21^\circ$  et  $69^\circ < \theta_1 < 90^\circ$ . La différence d'indice de réfraction entre la fibre optique et l'air, est donc suffisamment grande pour que tout rayon qui pénètre dans la fibre soit totalement réfléchi puisque  $\theta_1 > \theta_c$  est vérifié, quelque soit l'angle d'incidence  $\theta_i$ .

## 3.2 Les ondes évanescentes

### 3.2.1 Cas d'une fibre « classique »

La réflexion totale interne peut entraîner à la surface de la fibre, la création d'une onde progressive transversale, appelée évanescente (Fig. 5). Cette onde, aussi appelée *champ évanescent*, est de nature électromagnétique et pénètre dans le milieu de plus bas indice sur quelques micromètres.

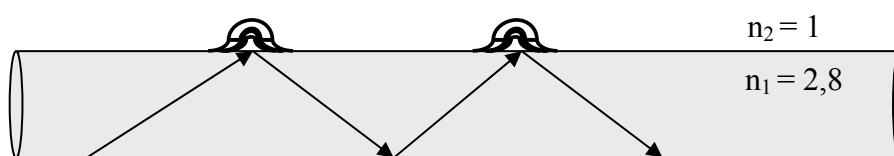


Fig. 5 : Représentation schématique du champ évanescent créé à la surface de la fibre, lors d'une réflexion totale interne.

Dans le cas où la fibre optique est mise en contact avec un milieu absorbant, une partie de l'énergie lumineuse sera perdue, et la réflexion sera donc atténuée. La profondeur de pénétration ( $d_p$ ) des ondes évanescentes dépend de plusieurs facteurs : la longueur d'onde, l'angle d'incidence du faisceau par rapport à la normale à l'intérieur de la fibre  $\theta$ , et des indices des deux milieux  $n_1$  et  $n_2$ . D'après Harrick [7], on peut écrire la relation II-8.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (\text{II-8})$$

L'amplitude du champ évanescent décroît exponentiellement à l'intérieur de l'échantillon. Il est à noter que plus la profondeur de pénétration dans l'échantillon sera grande, plus l'absorbance sera importante. Notons également, qu'il s'agit là d'une description simplifiée du phénomène et que la profondeur de pénétration dépend également de la partie imaginaire de l'indice de réfraction du milieu absorbant et de la polarisation du champ électromagnétique.

### 3.2.2 Cas des fibres effilées

Les fibres utilisées pour nos études, possèdent une configuration tout à fait particulière. Elles sont dites effilées. En effet, le diamètre est fortement réduit sur quelques centimètres, conduisant à un profil de diamètre de 450-100-450  $\mu\text{m}$ . L'obtention de telles fibres a été expliquée dans le chapitre I.

Il a été démontré que la sensibilité de la détection utilisant l'absorption par onde évanescente augmentait rapidement quand le diamètre de la fibre diminuait (Fig. 6) [8-10].

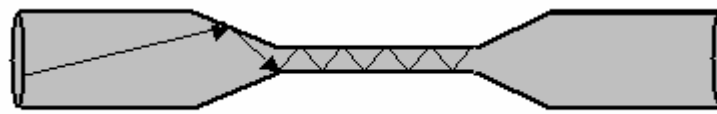


Fig. 6 : Propagation des ondes dans une fibre effilée.

En effet, le nombre de réflexion  $N$  à l'intérieur de la fibre augmente quand le diamètre  $d$  de la fibre diminue, selon la relation II-9.

$$N = z \tan \frac{\theta}{d} \quad (\text{II-9})$$

avec  $\theta$  : angle d'incidence

$z$  : longueur de contact fibre/échantillon

Cependant, pour faciliter l'injection du faisceau lumineux dans la fibre, il est nécessaire que son diamètre d'entrée soit suffisamment grand. En effet, l'intensité lumineuse qui pénètre à l'intérieure du guide, est proportionnelle au carré du diamètre de la fibre.

Ainsi, la partie de gros diamètre (450  $\mu\text{m}$ ) permet à un maximum de rayonnement IR d'être injecté dans la fibre, alors que la partie de plus petit diamètre (100  $\mu\text{m}$ ), la zone effilée, constituera la partie senseur, qui sera mise en contact avec l'échantillon à analyser.

### 3.3 Montage et principe de la mesure

Le montage utilisé pour enregistrer les spectres IR, se compose d'un FTIR de type BRUCKER V22, couplé à un détecteur Hg-Cd-Te (MCT) et d'une fibre effilée (Fig. 7). Dans la cas de la spectroscopie par ondes évanescentes, un miroir placé sur le trajet du faisceau modulé après son passage dans l'interféromètre de Michelson (annexe) permet de focaliser le rayonnement IR sur un dispositif de couplage. Le faisceau IR est ainsi réduit à l'entrée de la fibre optique, puis transmis. La partie effilée est intégrée dans une optrode, qui sera mise en contact avec l'échantillon à analyser. Celle-ci est constituée d'un bloc de polymère qui a pour but de maintenir la partie sensible de la fibre en « U » (Fig. 7) et permettre une meilleure prise en main du senseur.

Comme en transmission, le spectre est obtenu en enregistrant un spectre référence, la fibre à l'air, et un spectre échantillon, la partie senseur en contact avec l'échantillon. Le spectre en transmission comme précisé dans le paragraphe 1.1, est calculé selon la relation II-1.

Tous les spectres ont été enregistrés avec une résolution spectrale de  $4\text{ cm}^{-1}$  et une co- addition de 100 scans. Dans ces conditions, le temps d'acquisition est de 1 minute.

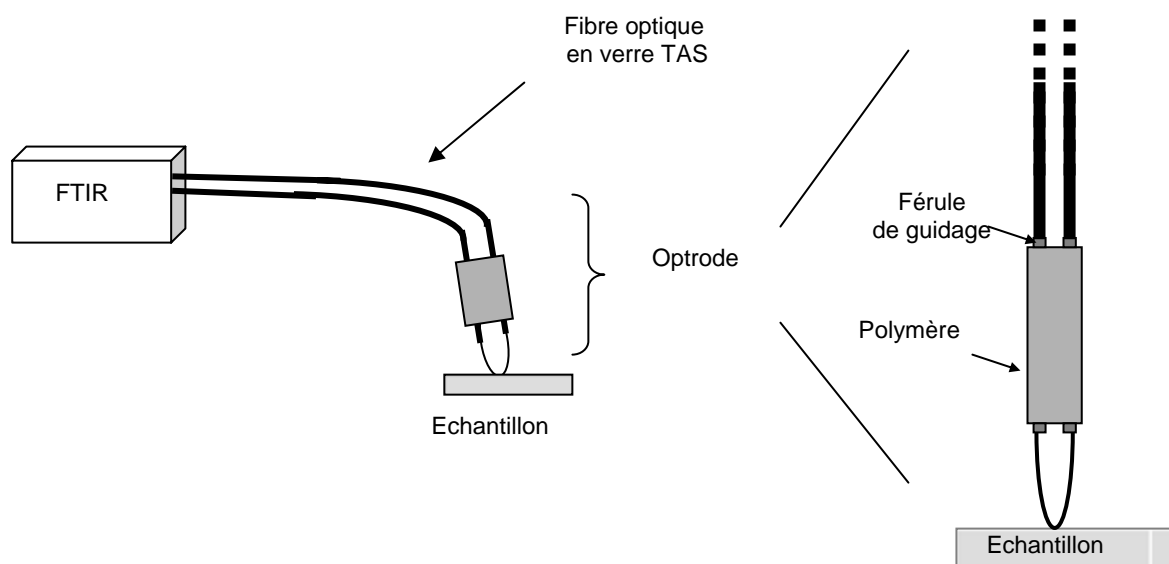


Fig. 7 : Représentation schématique du montage expérimental et de l'optrode.

### 3.4 Reproductibilité des mesures

Nous avons cherché à estimer le taux de reproductibilité des expériences effectuées avec la fibre optique. Pour cela, un milieu gélosé a été coulé dans une boîte de pétri. Puis, 10 spectres de gélose ont été enregistrés en plaçant manuellement la fibre à différents endroits sur la boîte de pétri. Pour chaque spectre, l'absorbance du pic à  $1636\text{ cm}^{-1}$  (vibration  $\delta\text{OH}$  de l'eau) a été mesurée. De plus, s'agissant d'un milieu gélatineux, il a été possible pour chaque acquisition, de mesurer la trace laissée par la fibre optique sur la gélose. La figure 8 représente les spectres moyen et déviations standards, obtenus à partir des 10 spectres enregistrés.

Ce test montre que pour une longueur de contact d'environ 3 mm, la déviation standard de l'absorption à  $1636\text{ cm}^{-1}$ , est de l'ordre de 0,0015 unité de DO. Ceci correspond à un coefficient de variation de  $\pm 4\%$  pour un positionnement manuel de la fibre. Le pourcentage de variation observé pour cette expérience montre une bonne reproductibilité des mesures avec cette technique.

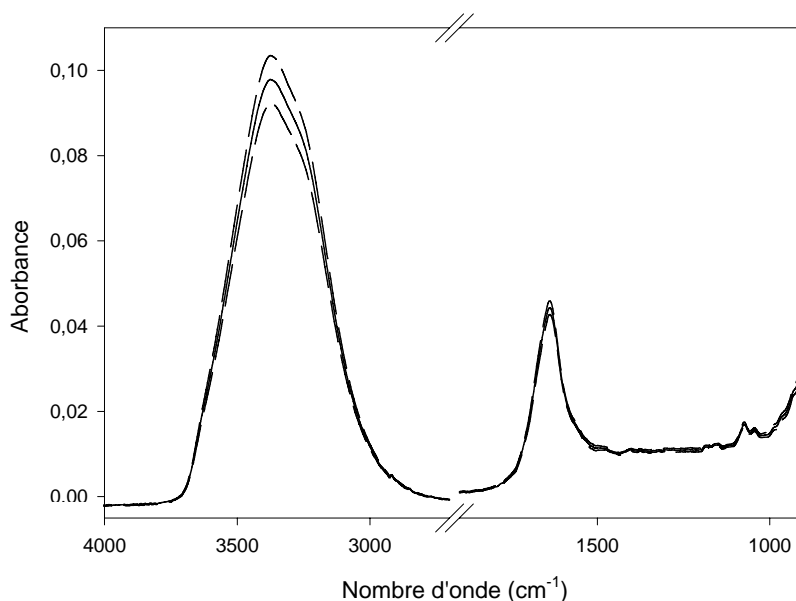


Fig. 8 : Spectres moyen ( — ) et déviations standards ( - - - ) obtenus à partir des 10 spectres de gélose enregistrés avec une longueur de contact de 3 mm.



### 3.5 Spécificité de la spectroscopie IR par fibre optique

#### 3.5.1 Distorsion du spectre

La figure 9 montre la comparaison entre un spectre IR obtenu en transmission et un spectre IR obtenu avec la fibre.

L'allure générale de ces deux spectres est la même, on y retrouve les mêmes bandes d'absorption. Cependant, on observe une distorsion entre ces deux spectres. L'absorbance est plus grande aux bas nombres d'onde pour le spectre obtenu avec la fibre optique par rapport au spectre obtenu en transmission. Ceci vient du fait que la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans l'échantillon, est inversement proportionnelle au nombre d'onde (équation II-8). Cette distorsion peut aisément être corrigée en spectroscopie ATR si l'on connaît les indices  $n_1$  et  $n_2$ , car dans ce cas, l'angle de réflexion est constant. Par contre, dans le cas d'une fibre optique, il faut considérer plusieurs angles de réflexion des ondes lumineuses à l'intérieur de la fibre. C'est pourquoi, il est plus difficile de la corriger.

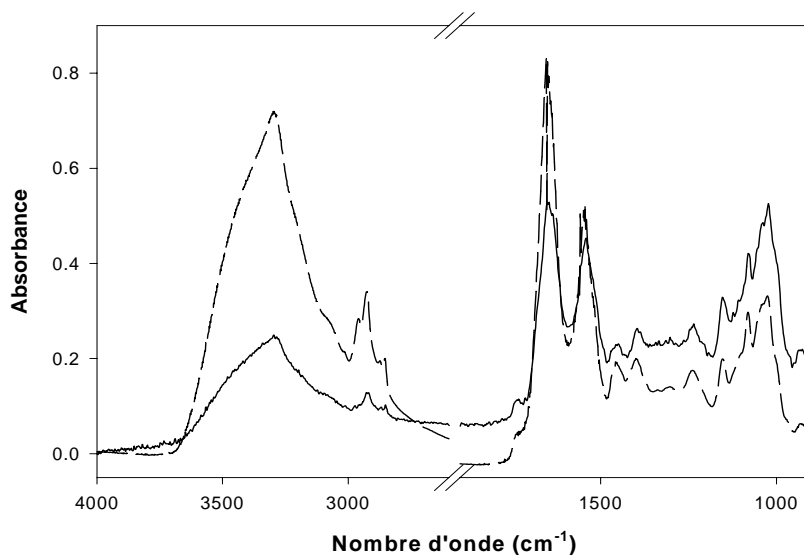


Fig. 9 : Spectres IR d'une coupe de foie de souris obtenue en transmission (---) et avec la fibre (—).

### 3.5.2 Paramètres influençant l'absorbance

Il a déjà été montré dans le paragraphe 3.2.2, comment le diamètre de la fibre pouvait influencer l'absorbance.

Deux autres paramètres importants influencent également l'absorbance. Il s'agit de la longueur de contact fibre/échantillon et de la concentration de l'échantillon. Selon la pseudo-loi de Beer-Lambert (II-10) [11 ;12], l'absorbance  $A$  est proportionnelle à la longueur de contact  $l$  et à la concentration  $c$ .

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{II-10}) \quad \text{avec } \varepsilon : \text{coefficient d'extinction.}$$

Ici, il ne faut plus considérer  $l$  comme étant l'épaisseur de l'échantillon traversée par le rayonnement IR, mais comme étant la longueur ou, plus précisément, la surface de contact fibre/échantillon. De précédentes études [13 ;14] ont montré la validité de cette loi. Finalement, plus la longueur de contact est grande, plus la quantité de molécules détectées est élevée et donc, plus l'absorption du signal est importante. Il en va de même pour la concentration de l'échantillon.

### 3.5.3 Hydrophobie de la fibre en verre TAS

Il s'est avéré important de déterminer si les fibres optiques en verre TAS possédaient une affinité pour les substances hydrophobes. Pour cela, la fibre, maintenue en «U» tout au long de l'expérience, a été plongée dans un bécher contenant initialement 40 ml d'eau. On y a ajouté ensuite de l'éthanol par aliquots de 2 ml et pour chaque ajout, un spectre MIR a été enregistré. Le mélange a été maintenu sous agitation pendant toute la durée de l'expérience.

Les pics compris entre 1250 et 950  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 10a) sont attribués aux vibrations C-O de l'éthanol. L'aire sous la courbe a été mesurée pour chaque spectre. La représentation de l'absorbance normalisée de ces deux pics, en fonction du pourcentage molaire d'éthanol (Fig. 10b) montre que l'intensité de ces bandes n'évolue pas linéairement avec la concentration d'éthanol. Ainsi à partir de 30 % d'éthanol (mol/mol), le signal est proche de celui de l'éthanol pur.

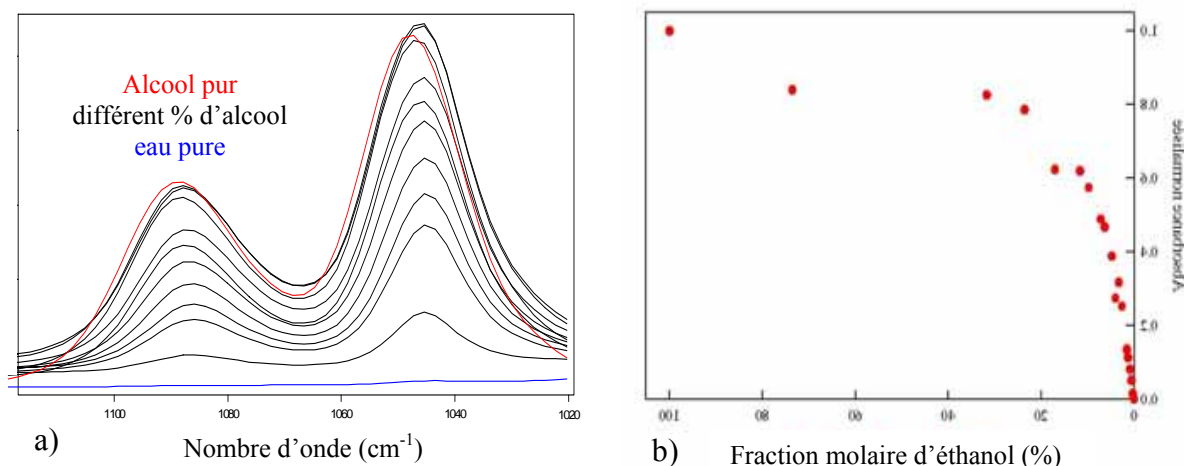


Fig. 10 : a) Spectres de l'eau pure, d'éthanol pur et des solutions mixtes. b) Absorbance normalisée des pics de l'éthanol, en fonction du pourcentage molaire d'éthanol contenue dans la solution .

Cette expérience montre donc une plus grande affinité de la fibre pour l'alcool que pour l'eau et démontre ainsi son caractère hydrophobe. Ce comportement est intéressant pour l'étude de systèmes biologiques qui sont, d'une manière générale, fortement hydratés. Une forte affinité polaire aurait contribué à d'avantage masquer les chromophores biologiques (paragraphe 2.3).

### 3.6 Biocompatibilité

#### 3.6.1 Des fibres toxiques ?

La non-toxicité de la fibre a été vérifiée en initiant le développement d'un biofilm bactérien (*Proteus mirabilis*), en contact permanent pendant plusieurs heures, avec un morceau de fibre en verre TAS. La figure 11 représente les photos prises lors du développement du biofilm en contact avec la fibre.



*Fig. 11 : Photos prises au cours du développement du biofilm bactérien (Proteus mirabilis) en contact avec un morceau de fibre en verre TAS.*

En étudiant l'interaction du morceau de fibre avec le front de migration, on ne constate aucun retard dans la division cellulaire et la migration. De plus, mis à part le simple contournement du fragment de la fibre, le front de migration n'est pas perturbé.

Les processus de différenciation, de division cellulaire et de communication inter-cellulaire ne sont donc pas perturbés par un contact prolongé avec la fibre. Ceci montre que les éléments chimiques constitutifs de la fibre (As, Se, Te) sont inertes, compte tenu de la grande stabilité du verre. Ces fibres peuvent donc être utilisées sans danger pour l'étude des cellules vivantes.

### 3.6.2 Interaction Fibre/Protéines

De nombreux supports utilisés en spectroscopie IR sont connus pour provoquer l'agrégation des protéines [14]. Lenk et al.(1989) [15] ont montré l'existence d'interactions protéine/cristal Ge, par des variations spectrales des bandes d'absorption de la sérumalbumine de bovin. De même, Binding et al. (2001) [16] ont mis en évidence la réactivité chimique qui existe entre les fonctions sulfures des protéines et les fibres  $\text{AgCl}_x\text{Br}_{1-x}$ . Un test a donc été effectué pour savoir si les fibres en verre TAS provoquaient la dénaturation des protéines par contact. Pour cela, la fibre a été plongée de façon prolongée, dans une solution de sérum albumine de bœuf à 1 g/l. Sans toucher au dispositif, un spectre MIR a été enregistré toutes les 15 min., sur une durée de 4 h. Le résultat obtenu est représenté sur la figure 12.

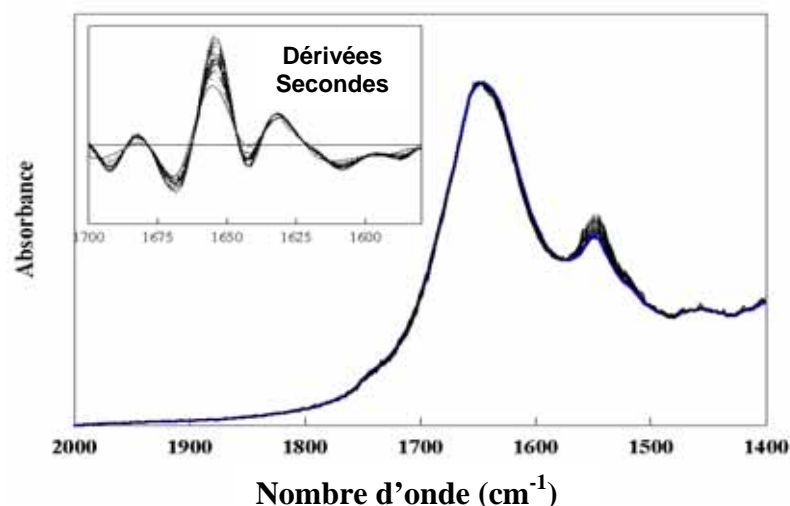


Fig. 12 : Spectres et dérivées secondes de sérum albumine de bœuf.

Les spectres de l'albumine ainsi que les dérivées secondes, obtenues au cours du temps sont tous identiques entre eux et à celui de l'albumine laissée 4 h sans contact avec la fibre. Plus précisément, la bande à  $1620\text{ cm}^{-1}$  caractéristique d'interactions inter-moléculaires [17] est absente. De même, la bande amide I, témoin de la structure secondaire des protéines, ne varie pas en fonction du temps. Tout ceci indique qu'il n'y a pas de modification de structure de l'albumine et que la fibre en verre TAS n'entraîne pas de dénaturation des protéines à leur contact.

#### 4. Méthodes d'acquisition IR

Pour valider nos résultats, nous avons à notre disposition d'autres techniques, plus classiques, d'acquisition de spectres IR :

- Transmission à travers des pastilles de  $\text{CaF}_2$
- ATR horizontal en ZnSe
- Microscopie ATR avec cristal Ge

#### 4.1 Transmission

Les spectres en transmission ont été réalisés à travers des pastilles de  $\text{CaF}_2$  dont la fenêtre spectrale est comprise entre 0,12 et 12  $\mu\text{m}$ . Cette technique nécessite un conditionnement particulier des échantillons puisqu'ils doivent être déposés sur une pastille d'environ 1 cm de diamètre. En ce qui concerne les applications en biologie, cette technique est plus particulièrement adaptée à l'étude de coupes de tissus. Les spectres obtenus sont de bonne qualité. Cependant, les biopsies doivent être homogènes, pour pouvoir comparer les résultats. Par contre, cette technique est peu adaptée à l'étude de liquide du fait de l'utilisation de pastilles. Surtout, il n'est pas envisageable de réaliser des études sur des cellules vivantes.

#### 4.2 ATR horizontal en ZnSe

Le principe des dispositifs ATR est de faire subir au faisceau optique plusieurs réflexions à l'interface entre un cristal d'indice de réfraction élevé et l'échantillon. Nous avons utilisé un banc parallélépipédique en sélénure de zinc ( $\text{ZnSe}$ ) d'indice de réfraction 2,4 et sur une plage de fréquence allant de 20 000 à 650  $\text{cm}^{-1}$ . Compte tenu de la différence d'indice de réfraction entre les deux milieux et de l'angle d'incidence constant ( $45^\circ$ ), le rayonnement IR pénètre d'environ une demi longueur d'onde dans l'échantillon à chaque réflexion. L'absorption résulte d'environ dix réflexions totales atténuées. Le spectre final, après correction de la profondeur de pénétration en fonction du nombre d'onde, est identique à un spectre obtenu par transmission, si l'on considère un trajet optique de 1 à 2  $\mu\text{m}$ .

Le principal inconvénient de cette technique vient du fait que le cristal est cher et très fragile. De plus, il a tendance à réagir avec les protéines et les tensioactifs. L'échantillon analysé doit être de la dimension du banc  $\text{ZnSe}$  (5 cm X 1 cm) pour obtenir un spectre présentant un bon rapport signal/bruit. Cette technique ne convient donc pas à des échantillons de petites tailles ou disponibles en petites quantités. De même, des études *in vivo* ne sont pas envisageables avec cette technique.

### 4.3 Microscopie ATR avec cristal Ge

La microscopie ATR permet de réaliser des cartographies et de l'imagerie. Celui que nous avons utilisé (Continuum, Nicolet) est équipé d'un cristal de germanium (Ge). Ce cristal est simple réflexion avec un angle d'incidence de  $45^\circ$  et convient donc mieux à l'étude d'échantillons très absorbants. Son indice de réfraction est de 4. Il est très sensible aux bases et acides forts. Il convient pour des échantillons de petite taille car le diamètre de contact cristal/échantillon est de  $50\ \mu\text{m}$ . De même que pour le banc ZnSe, son prix est élevé et il faut le manipuler avec beaucoup de précautions à cause de sa grande fragilité. De plus, la mise en œuvre demande un personnel spécialisé.

### 4.4 Fibre optique en verre TAS

L'utilisation d'un tel senseur offre de nombreux avantages. Tout d'abord, le conditionnement des échantillons n'est pas nécessaire, il y a donc peu de limitation d'étude. En effet, c'est la fibre, de par sa flexibilité et sa longueur, qui va venir au contact de l'échantillon. De plus, ce système permet de transmettre le signal sur de longues distances (plusieurs mètres), rendant possibles des études dans des milieux difficiles d'accès. Ce système permet, par exemple, l'étude d'échantillons contenus dans une enceinte sous atmosphère contrôlée [8]. Plus particulièrement, elle permet des analyses *in situ*, intéressantes pour des applications dans le domaine médical. Enfin, contrairement au cristal Ge et au banc ZnSe, l'élaboration de fibres optiques est peu coûteuse, et sa mise en œuvre est aisée.

## 5. Traitements des données spectrales

### 5.1 Dérivées secondes

Pour traiter les spectres infrarouges et optimiser leur exploitation, le spectroscopiste a souvent recouru à l'analyse de la dérivée seconde des spectres. D.G. Cameron et D.J. Moffatt ont largement décrit ce traitement [18 ;19].

Le calcul de la dérivée seconde des spectres permet d'augmenter la résolution spectrale par la détection des épaulements présents lors de recouvrements spectraux importants entre les bandes.

## 5.2 Analyse en composantes principales

La chimiométrie est la science de l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques, qui visent à extraire l'information utile présente dans des données de mesures chimiques. Parmi les méthodes chimiométriques, on trouve l'**Analyse en Composantes Principales** (ACP), qui donne une description et une modélisation des données spectrales. Cette méthode permet d'apprécier les différences ou les ressemblances entre les spectres. En effet, une carte factorielle (ou carte de ressemblance) est obtenue, dans laquelle chaque spectre est représenté par un point sur un graphique. L'ACP permet ainsi à des non-spécialistes de déterminer la famille de spectres à laquelle appartient celui testé, ou si un échantillon est conforme ou non.

Le principe de l'ACP est de remplacer les variables d'origines (absorbance) fortement redondantes, par des variables synthétiques, les composantes principales [1 ; 4]. Plusieurs étapes sont nécessaires. On écrit tout d'abord la matrice  $X$  qui représente les  $n$  spectres testés à  $p$  longueurs d'ondes :

$$X = \begin{matrix} & \begin{matrix} 1 & \cdots & p \end{matrix} \\ \begin{pmatrix} \\ \\ \\ \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} 1 \\ \vdots \\ n \end{pmatrix} \end{matrix}$$

Dans cette matrice, le spectre moyen a été préalablement retiré à chaque spectre de départ. Puis, on calcul le produit des matrices :  $X^t.X$ , où  $X^t$  représente la transposée de la matrice  $X$ . Le produit de ces matrices (matrice  $pp$ ), est ensuite diagonalisé. C'est ainsi que l'on obtient  $p$  valeurs propres associées à  $p$  vecteurs propres.

Les valeurs propres constituent une nouvelle représentation des spectres de départ, non plus dans une base en longueurs d'onde mais dans une base en vecteurs propres. Plus la valeur propre est grande, plus la contribution du vecteur propre qui lui est associé est importante. En



fait, chaque spectre de départ est, en réalité, une combinaison linéaire des vecteurs propres. Le principe de l'ACP consiste alors à représenter les coefficients sur un graphique où chacune des dimensions correspond à un vecteur propre. Généralement, on choisit deux vecteurs propres correspondant aux deux valeurs propres les plus élevées. Les spectres peuvent ainsi être regroupés ou non, logiquement, en fonction d'un ou des paramètre(s) qui les différencie(nt) ou les rapproche(nt). L'ACP établit donc un modèle linéaire de décomposition spectrale qui peut avoir un sens pour le spectroscopiste. Les vecteurs propres apparaissent, en effet, comme étant des analogues à des spectres de produits purs.

L'ACP permet ainsi une analyse rapide d'échantillons, sans avoir besoin d'attribuer les bandes d'absorption.

## 6 Conclusion

La spectroscopie IR est une technique de choix pour l'analyse biologique car elle donne une image complète et globale de l'échantillon dans un temps limité. L'acquisition d'un spectre dans nos conditions d'enregistrement dure environ 1 min.

Grâce à leur propriétés exceptionnelles de transparence dans le MIR, les fibres en verre TAS sont des outils uniques pour acquérir de tels spectres par FEWS (Fiber Evanescent Wave Spectroscopy). En effet, le design particulier mis au point permet d'atteindre une sensibilité inégalée et une très grande souplesse d'utilisation rendant possibles des études *in situ*. De plus, le caractère hydrophobe de la fibre la rend particulièrement adaptée aux études *in vivo* d'échantillons biologiques. Enfin, il a été démontré qu'aucun artefact ou dysfonctionnement n'était provoqué par la présence de la fibre dans les milieux biologiques testés.

En conclusion, il apparaît, comparé aux autres outils d'acquisitions de spectres IR, que la fibre optique présente des avantages décisifs.

## RÉFÉRENCES

- [1] D. Bertrand et D. Dufour, « *La spectroscopie et ses applications analytiques* », Ed. Tec et Doc, Paris (2000), 31-74.
- [2] F. Rouessac et A. Rouessac, « *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes* », Durod, (1998), 4<sup>ème</sup> Ed., 147-171.
- [3] M. Jackson, H.H. Mantsch “*Infrared Spectroscopy of Biomolecules*”, Mantch H.H., D. Chapman eds., New York, Wiley-Liss (1996), 311-340.
- [4] D. Naumann, “*Infrared Spectroscopy in Microbiology*” (Encyclopedia of analytical Chemistry) R.A. Meyers (Ed.), Chichester, Wiley & Sons Ltd. (2000), 102-131.
- [5] J.J. Max, C. Chapados, *App. Spectros.*, (1998), 52(7), 963-969.
- [6] J.J. Max, M. Trudel, C. Chapados, *App. Spectrosc.*, (1998), 52 (2), 234-239.
- [7] N.J. Harrick, « *Internal Reflexion Spectroscopy* », Ossiming, New York, (1979).
- [8] S. Hocdé, C. Boussard-Plédel, D. Lecoq, G. Fonteneau, J. Lucas, *SPIE*, (1999), 3849, 50-59.
- [9] S. Hocdé, C. Boussard-Plédel, G. Fonteneau, D. Lecoq, H.L Ma, J. Lucas, *J. Non-Cryst.Solids*, (2000), 274, 17-22.
- [10] M. Katz, A. Katzir, I. Schnitzer, A. Bornstein, *Appl. Optics*, (1994), Vol.33, N°25, 5888-5894.
- [11] M.D. Degrandpre, L.W. Burgess, *Anal.Chem.*, (1988), 60, 2582-2586.
- [12] J. Heong, M. Rodrigues, S.J. Saggese, G.H. Sigel Jr., *Applied Optics*, (1991), 20 September Vol. 30, No.27.
- [13] J.J Sanghera, F.H Kung, P.C. Pureza, V.Q. Nguyen, R.E. Miklos, I.D. Aggarwal, *Appl. Optics*, (1994), Vol.33, N°27, 6315-6322.
- [14] M. Jackson, H. Mantsch, *Appl. Spectros.*, (1992), 46 : 699-701.

[15] T.J. Lenk, B.D. Ratner, R.M. Gendreau, K.K. Chiturs, *J. Biomed. Mat. Res.*, (1989), 23 : 549-569.

[16] U. Binding, M. Meinke, I. Gasonde, O. Specher, I. Vasserman, A. Katzir, G. Muller, *Sensor and Actuator B*, (2001), 74, 37-46.

[17] A.H. Clark, D.P.H. Saunderson, A. Suggett, *Int. J. Peptide Protein Res.*, (1981) 17, 353-364.

[18] D.G. Cameron, D.J. Moffatt, *Applied Spectroscopy*, (1987) Vol. 41, N°4.

[19] H.H. Manstch, D.J. Moffatt, H.L. Casal, *Journal of molecular structure*, (1988), 173, 285-298.

# CHAPITRE III

## APPLICATION EN BIOLOGIE

### ANALYSE D'UN TISSU

## 1. Introduction

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme [1], avec un poids d'environ 1,5 kg, chez l'Homme. Il accomplit plusieurs fonctions indispensables à la vie, notamment par le rôle majeur qu'il joue en métabolisant sans cesse les nutriments ingérés de façon intermittente. Le foie fournit à l'organisme un flux continu de métabolites susceptibles d'être transformés en énergie. Il joue ainsi un grand rôle dans le métabolisme des lipides, glucides et protéines. Une autre fonction importante du foie est la sécrétion de la bile par les cellules hépatiques, qui est ensuite stockée par la vésicule biliaire. Par ailleurs, il joue également un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques.

Les principales cellules, les hépatocytes, représente 80 % des cellules du foie, ce sont les unités de base, riches en substance de réserve : le glycogène. Elles sont regroupées pour former des lobules, où cheminent des vaisseaux et des canaux biliaires intra-hépatiques [1]. L'ensemble du foie, est entouré d'une enveloppe appelée capsule de Glisson. Cette capsule, ne constitue pas une membrane classique de phospholipides mais une matrice cellulaire qui n'a pas la même fonction que les cellules hépatiques proprement dites.

Le foie peut donc être le siège de nombreuses pathologies qui vont être responsables d'altérations métaboliques. Le parenchyme hépatique est donc un organe de choix pour analyser les modifications spectrales associées à des modifications métaboliques, physiologiques ou pathologiques. C'est pourquoi, dans ce chapitre, nous avons cherché à analyser les modifications spectrales du tissu hépatique, consécutives à une situation physiologique (le jeûne), et deux situations pathologiques, le diabète non insulino-dépendant avec hyperlipidémie et la surcharge en fer.

Pour nos études, nous avons choisi le foie de souris pour modèle. Ces analyses permettront de déterminer le potentiel de ce capteur à fibre optique, en imagerie métabolique à partir de biopsies ou de foies frais. Nous verrons comment il est possible de caractériser une anomalie du métabolisme à partir des spectres MIR.

Les analyses réalisées à partir de foies frais, diront s'il est possible de détecter des altérations métaboliques à travers la capsule de Glisson.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le Dr. Olivier Loréal de l'Unité 522 de l'INSERM de Rennes.

## 2. Principe de l'expérience

Le principe de ces expériences est de détecter et de caractériser des variations spectrales liées à un dysfonctionnement des fonctions métaboliques du foie. Pour cela, trois thématiques seront abordées :

- l'obésité
- les conséquences d'un jeûne
- la surcharge en fer

Tous les échantillons ont été analysés par spectroscopie à l'aide de la fibre optique en verre TAS. Pour valider les résultats obtenus, les échantillons ont également été analysés par spectroscopie IR en transmission et des analyses histologiques et biochimiques ont été effectuées en parallèle.

### 2.1 Prélèvements hépatiques

Tous les animaux ont été entretenus suivant la réglementation du Ministère de l'Agriculture, à une température de 20°C avec un cycle jour/nuit de 12 h, et ont reçu une alimentation standard (AO3, UAR, France) *ad libitum*.

Avant les prélèvements, les souris sont toutes anesthésiées. Un prélèvement sanguin intra-cardiaque est réalisé. Après coagulation, le sang est centrifugé (3500 *tpm* pendant 10 min.). Le sérum qui surnage, est alors recueilli, aliquoté et congelé à -80°C.

Selon l'analyse qui sera réalisée, les foies, après ablation, sont traités différemment. Des biopsies de foies ont été congelées directement dans l'azote liquide, puis conservées à -80°C. D'autres, ont été fixées dans le formaldéhyde à 4 %. Pour cela, elles ont été déshydratées (3 bains d'éthanol, 3 bains de toluène) puis incluses dans la paraffine. Ces biopsies sont

préparées pour une étude histologique par microscopie optique [2]. Les coupes de 5  $\mu\text{m}$  sont effectuées soit au microtome pour les prélèvements inclus en paraffine, soit à l'aide d'un cryotome, pour les prélèvements congelés. Les coupes incluses en paraffine sont déparaffinées (bains successifs de toluène, puis d'alcool), avant d'être passées dans l'eau puis colorées par histochimie.

D'autres foies ont été analysés frais et entiers, directement après ablation.

## 2.2 Analyse IR par fibre optique

Les études ont été réalisées soit à partir de coupes de foie, soit à partir de l'organe entier. Des coupes de 10  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à congélation, à l'aide d'un cryostat. Puis, elles ont été directement déposées sur la partie effilée de la fibre optique, sur une longueur d'environ 1 cm. Avant chaque dépôt, un spectre simple faisceau, la fibre à l'air, a été enregistré comme mesure de référence. Les biopsies déposées sur la fibre sont laissées à l'air pendant 12 h. Puis un second spectre simple faisceau est enregistré dans les mêmes conditions, avec cette fois, la biopsie déposée sur la fibre. Pour optimiser le rapport signal/bruit, la résolution spectrale a été fixée à 4  $\text{cm}^{-1}$  avec une co-addition de 100 scans. Le spectre IR de l'échantillon est obtenu en faisant le rapport des spectres simples faisceaux obtenus avec et sans échantillon (équation II-1). Une fois la biopsie déposée sur la partie senseur, elle s'enroule et se retrouve collée sur la fibre. Le nettoyage est donc, pour ce type d'expérience, une étape difficile. C'est pourquoi, pour les analyses réalisées à partir de biopsies de foie, chaque fibre n'a servi qu'à une seule mesure.

Pour les études réalisées sur l'organe entier, la partie senseur a été directement mise en contact avec le foie frais. Les conditions d'enregistrement (résolution et nombre de scans) sont les mêmes que pour les expériences réalisées à partir de coupes de foies. Par contre, pour ce genre d'application, toutes les mesures ont été réalisées avec une même fibre. Après chaque mesure, la partie senseur de la fibre est rincée plusieurs fois à l'eau distillée, puis séchée à l'air. Avant chaque mesure, un spectre référence est enregistré afin de s'affranchir de la contribution des éventuels résidus de tissus et/ou sang qui auraient pu rester collés sur la fibre.

### 2.3 Analyse IR en transmission

A titre de contrôle, des coupes de foie de 10  $\mu\text{m}$  de chaque échantillon, obtenues par coupe au cryotome, ont été analysées par spectroscopie IR classique en transmission. Pour ce faire, les coupes ont été déposées sur des pastilles de  $\text{CaF}_2$  et les spectres IR ont été enregistrés avec une résolution spectrale de  $4\text{ cm}^{-1}$  et une co-addition de 32 scans.

### 2.4 Analyses histochimiques des échantillons

Afin de déterminer d'éventuelles altérations du métabolisme dans le foie, des colorations histochimiques ont été réalisées sur tous les échantillons. Il s'agit de méthodes permettant la caractérisation de constituants chimiques tissulaires sans altérer la morphologie du tissu [2]. Les colorations sont réalisées à partir de coupes de foie de 5  $\mu\text{m}$ .

La coloration **Héματοxylique Eosine Safran** (HES) est une coloration trichromique alliant une laque nucléaire (héματοxyline), un colorant cytoplasmique (éosine) et un colorant du collagène (safran). Cette analyse est réalisée à partir de coupes de foies incluses dans la paraffine. Elle permet d'apprécier l'architecture du foie et des cellules.

La coloration à l'**Acide Périodique de Schiff** (PAS), est un oxydant qui rompt les liaisons covalentes entre deux fonctions OH d'un glucopyranose. Les deux fonctions aldéhydes ainsi créées réduisent le leucodérivé de la fuchsine basique de Schiff qui devient rose. Cette coloration nous permet d'apprécier la quantité de glycogène contenue dans les tissus des foies analysés. Une contre coloration à l'héματοxyline permet un bon contraste et une meilleur analyse topographique. Cette analyse est réalisée à partir de coupes de foies incluses dans la paraffine.

La coloration de **Pearl's** permet de mettre en évidence les dépôts de fer dans les tissus. Le fer ferrique réagit avec le ferrocyanure de potassium pour donner un précipité insoluble de bleu de Prusse. Une contre-coloration nucléaire au rouge permet d'obtenir un meilleur contraste. Cette analyse est réalisée à partir de coupes de foies incluses dans la paraffine.



La coloration à l'**Huile Rouge**, colorant neutre, permet de colorer les vésicules lipidiques neutres en rouge-orange. Plus particulièrement, elle révèle la présence de triglycérides. Son coefficient de partage fait qu'elle reste dissoute dans les vésicules lors du rinçage. Cette analyse est réalisée à partir de coupes de foies congelées pour éviter la perte des lipides consécutives au processus de déshydratation.

### 3. Etude des foies de souris obèses

#### 3.1 Les souris obèses

Les souris ob/ob découvertes en 1950, sont porteuses d'une mutation qui les rend massivement obèses, diabétiques et infertiles [3]. Le gène responsable a été découvert en 1994, il s'agit du gène *ob* codant la **leptine** [4] sécrétée par les adipocytes (cellules stockant les graisses). Chez les souris ob/ob, ce gène est muté. La leptine est une hormone de 146 acides aminées (16 kDa) qui joue un rôle primordial dans la régulation de la satiété, en inhibant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique. La mutation de ce gène est à l'origine de l'obésité chez ces souris [5].

Les souris ob/ob sont homozygotes pour la mutation du gène de la leptine et produisent une leptine non fonctionnelle. Ces souris présentent donc une hyperphagie (mangent constamment) et développent une obésité majeure avec notamment, une stéatose hépatique (accumulation de triglycérides dans le foie) et un diabète non insulino-dépendant (maladie métabolique caractérisée notamment par un excès de glucose dans le sang).

#### 3.2 Mode opératoire

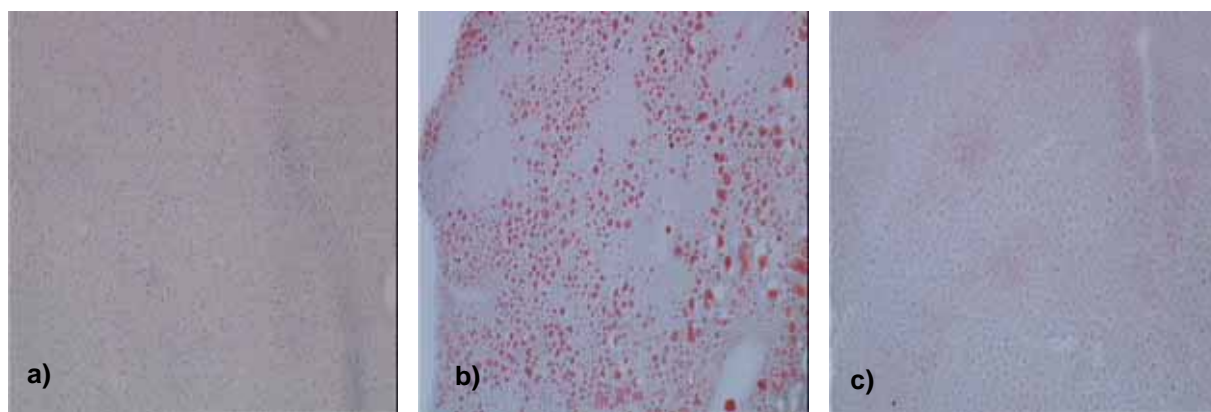
Le foie, nous l'avons vu, est recouvert d'un tissu conjonctif, appelé **capsule de Glisson**. Cette capsule possède un rôle de maintien et n'intervient pas dans le métabolisme du foie. Cette expérience vise à déterminer s'il est possible de différencier spectralement un foie

pathologique d'un foie dit normal, lorsque la fibre optique est mise en contact avec cette capsule.

Nous avons donc travaillé pour cette étude sur foies frais entiers. Cinq souris mâles ob/ob et cinq souris mâles normales, ob/+ (hétérozygotes pour le gène *ob*), toutes âgées de 4 semaines et de même fond génétique C57BL/6J, ont été incluses dans l'étude. Elles n'ont subi aucun traitement particulier et 8 semaines plus tard, les foies ont été prélevés sur les souris, et déposés aussitôt dans la glace. Pour ces expériences, nous avons travaillé sur l'organe entier, c'est pourquoi, les spectres infrarouges ont été enregistrés par fibre optique dans l'heure qui a suivi le prélèvement des foies. La fibre a été mise au contact de la capsule de Glisson qui entoure l'organe entier puis, chaque foie a été sectionné à l'aide d'un scalpel afin que la fibre optique puisse être mise également en contact avec les cellules du foie. Les foies de souris ob/ob correspondent aux échantillons 02S74, 76, 78 et 80, et les foies de souris ob/+, aux échantillons 02S73, 75, 77 et 79. Les souris du lot ob/ob seront les souris dites « obèses » et les souris du lot ob/+, les souris dites « normales ». La fibre a été placée manuellement, avec une longueur de contact équivalente pour chaque tissu frais.

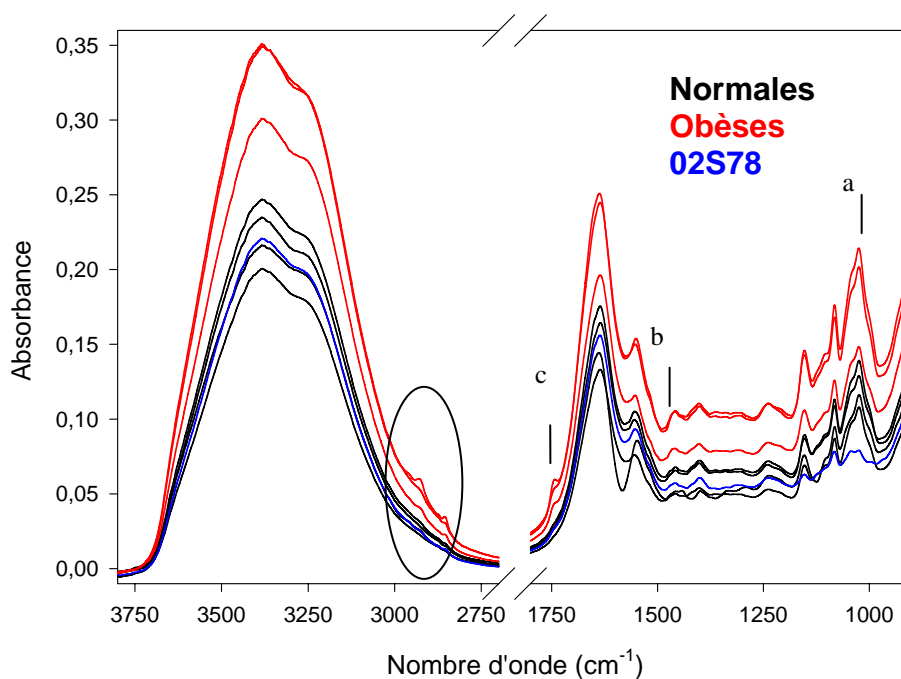
### 3.3 Analyse des échantillons

Les souris obèses ont atteint un poids moyen de  $52,7 \pm 10$  g. Cependant, sur les quatre souris, une se démarque, la souris obèse 02S78 avec un poids de 38 g seulement. Sur les trois restantes, le poids moyen devient alors  $57,5 \pm 2,5$  g. Les souris normales ont un poids moyen de  $31,5 \pm 2,4$  g. Les souris obèses 02S74, 76 et 80, ont toutes développé une obésité majeure. Les colorations à l'huile rouge (Fig. 1) des coupes de foie des souris obèses, ont montré la présence d'énormes vésicules rouge-orange à l'intérieur des hépatocytes, témoins d'une accumulation de lipides neutres (stéatose) excepté pour la souris obèse 02S78 dont la coloration ne montre qu'une légère stéatose. Chez les souris contrôles, aucune stéatose n'est mise en évidence.



*Fig. 1 : Colorations histochimiques à l'huile rouge des biopsies de foies de souris a) contrôle ob/+, b) obèse ob/ob et c) de la souris obèses 02S78. La stéatose est visualisée sous forme de volumineuses inclusions rouges (agrandissement original X 400).*

Nous avons tout d'abord analysé les foies frais, sur la tranche de section. La figure 2 représente les spectres IR obtenus. La comparaison des spectres de foies de souris normales et obèses, montrent des différences très nettes.



*Fig. 2 : Spectres IR des cellules de foie frais de souris normales et obèses.  
a)  $1029\text{ cm}^{-1}$ , b)  $1465\text{ cm}^{-1}$ , c)  $1745\text{ cm}^{-1}$ .*

Spectralement et d'une façon générale, les deux groupes de spectres se distinguent par leur absorbance, excepté pour la souris obèse 02S78. Tout d'abord, les pics compris entre 1200 et 1000  $\text{cm}^{-1}$  augmentent fortement sur les spectres des souris obèses. Ces pics sont attribués aux vibrations de liaisons contenues dans les molécules de sucres [6]. L'augmentation de ce massif de pics est attribuée à un taux de sucre plus important dans les foies de souris obèses. Plus particulièrement, le pic à 1029  $\text{cm}^{-1}$  (a) qui a fortement augmenté sur les spectres de souris obèses, est attribué à la vibration de liaison C-O exocyclique du glycogène [7]. Ce résultat est en faveur de la glycogénogénèse (stockage du glucose sous forme de glycogène) dans le foie.

Les pics compris entre 3000  $\text{cm}^{-1}$  et 2850  $\text{cm}^{-1}$  sont attribués aux vibrations des méthyle et méthylène des lipides [8]. Leur intensité est plus importante chez les souris obèses, ce qui indique un fort taux de lipides. La présence du pic à 1745  $\text{cm}^{-1}$  (c), indique qu'il s'agit plus précisément d'une accumulation de triglycérides. En effet, cette bande est attribuée à la vibration de la liaison C=O, que l'on retrouve dans la fonction ester de ces molécules. Ceci est confirmé par l'augmentation des pics à 3008 et 1465  $\text{cm}^{-1}$  (b). Ces pics sont attribués respectivement, aux vibrations de liaisons C-H des groupements  $>\text{C}=\text{CH}-\text{C}$  et  $\text{CH}_2$ , que l'on retrouve également dans les triglycérides [8].

La souris 02S78 ne se classe pas d'après son profil spectral, dans le groupe des souris obèses. On ne retrouve pas d'augmentation d'intensité des pics des lipides (3000 à 2850  $\text{cm}^{-1}$ ), et les pics des sucres (1200 à 1000  $\text{cm}^{-1}$ ) sont de très faible intensité. Ce résultat est corrélé, d'une part, avec les études histologiques qui montrent seulement une très faible stéatose en huile rouge (Fig. 1), localisée en périphérie de certains vaisseaux (veine centrolobulaire), contrairement aux autres souris obèses 02S74, 76 et 80, et d'autre part, avec un poids (38 g) plus proche de celui des souris normales. Cette souris possède un phénotype qui n'est pas celui d'une souris ob/ob comme attendu.

De précédentes études [9], ont montré qu'un décalage des bandes caractéristiques des protéines, vers de plus bas nombres d'onde, était observé quand il y avait diabète. Nous avons donc analysé les bandes d'absorption des protéines. D'après l'analyse des dérivées secondes (Fig. 3), le profil spectral de la bande Amide II sensible à la structure secondaire des protéines

[10], se décompose en deux petites bandes, autour de 1554 et 1544  $\text{cm}^{-1}$  pour les souris normales. Par contre, sur les dérivées des spectres de foie de souris obèses, la bande Amide II ne forme qu'une seule bande plus intense, autour de 1551  $\text{cm}^{-1}$ .

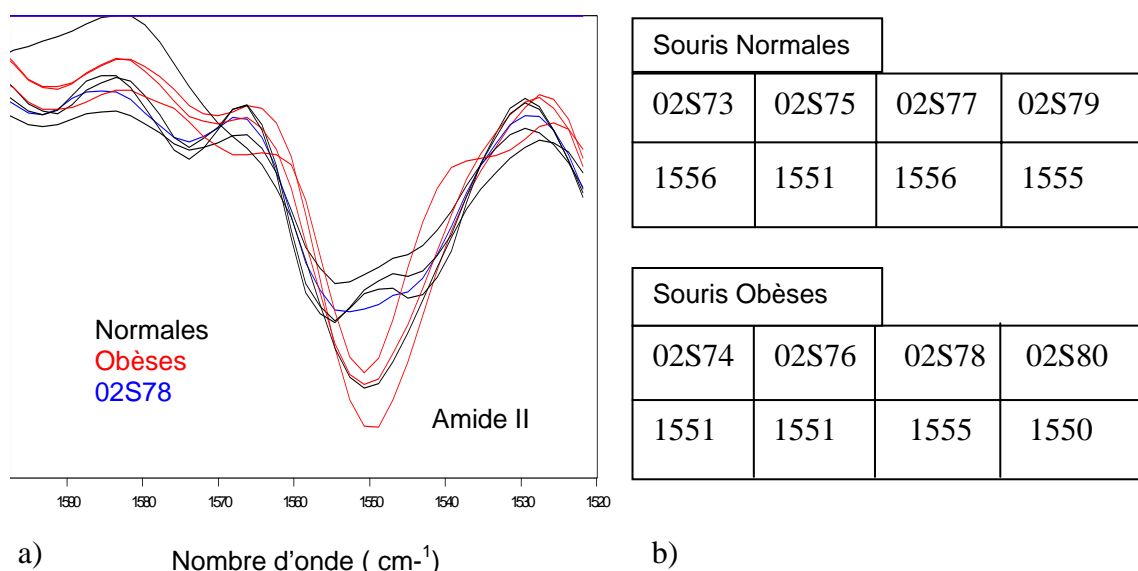


Fig. 3 : a) Dérivées secondes des spectres de cellules de foies frais de souris normales et obèses. b) Position en  $\text{cm}^{-1}$ , de la bande Amide II d'après les dérivées secondes.

Le tableau de la figure 3 montre un décalage de la bande Amide II de 1555 à 1551  $\text{cm}^{-1}$ , témoignant d'une altération du profil des spectres dans les foies de souris ob/ob. Ce décalage pourrait être dû à l'existence d'un diabète. La position de cette bande pour la souris normale 02S75 à 1551  $\text{cm}^{-1}$ , n'a pu être expliquée.

Les analyses faites en spectroscopie IR en transmission sur les biopsies de foies, ont conduit aux mêmes conclusions que celles réalisées par fibre optique en contact avec le tissu hépatique.

Nous avons également cherché à caractériser des variations spectrales, avec la fibre optique directement en contact avec la capsule de Glisson. Cependant, l'étude spectrale ne montre pas clairement de différence entre ces deux groupes de souris. La présence de cette structure ne permet pas d'enregistrer de variation spectrale due à des modifications du métabolisme dans les hépatocytes.

### 3.4 Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence chez les souris obèses, une accumulation de triglycérides. Ce résultat est confirmé par les colorations à l'huile rouge et l'analyse des spectres en transmission. La stéatose (excès de triglycérides dans le foie) dans le cas des souris obèses, est consécutive à un excès d'apport alimentaire de nutriment.

Cette étude montre également une anomalie du métabolisme des sucres. La forte augmentation d'intensité de la bande à  $1029\text{ cm}^{-1}$  caractéristique du glycogène, semble indiquer une forte concentration de glycogène. Ce résultat n'a pu être confirmé par les colorations PAS, pas assez sensible pour différencier les quantités de sucres entre les hépatocytes de souris normales et obèses, qui présentent de profondes modifications de structure cellulaire liées à la présence de stéatose.

De plus, cette étude a révélé le phénotype particulier de la souris 02S78 introduite dans l'étude comme étant une souris obèse. Les résultats des études spectrales et histologiques sont en accord et permettent de conclure que cette souris n'a effectivement pas toutes les caractéristiques d'une souris ob/ob.

Cette étude révèle également que la capsule de Glisson reste un obstacle à la détection de variations métaboliques liées à une pathologie hépatique. L'épaisseur de cette capsule est de l'ordre de  $15\text{ }\mu\text{m}$ , et l'onde évanescente ne pénètre pas assez profondément ( $1\text{ }\mu\text{m}$ ) dans l'échantillon, pour pouvoir analyser les hépatocytes. Cependant, lorsque la fibre est en contact avec les cellules du foie, des différences spectrales peuvent être caractérisées. Dans cette étude nous avons travaillé sur foie frais, et la présence de l'eau contenue en grande quantité dans les cellules, n'a pas été un obstacle pour la mise en évidence de variations spectrales liées aux modifications du métabolisme du foie.

## 4. Conséquences d'un jeûne sur les constituants cellulaires du foie

L'organisme utilise en permanence des substrats énergétiques pour maintenir ses fonctions vitales, alors que la fourniture de ces substrats par l'alimentation, est périodique. De

ce fait, l'organisme a développé des processus de stockage de l'énergie absorbée en excès pendant les repas, et sa libération durant les périodes de jeûne.

C'est pourquoi, nous avons analysé l'influence de la durée du jeûne sur le métabolisme hépatique. Par ailleurs, le fond génétique pouvant moduler les capacités génétiques métaboliques, nous avons analysé l'influence de ce fond sur le jeûne.

#### 4.1 Influence de la durée du jeûne sur le métabolisme hépatique

Dans cette analyse, des souris ont été placées en restriction alimentaire pendant différentes durées. Ces expériences ont pour but d'évaluer le potentiel de cette technique spectroscopique, d'un point de vue quantitatif en étudiant l'évolution du métabolisme dans le foie, au cours d'un jeûne.

##### 4.1.1 Mode opératoire

Les expériences ont été réalisées avec des souris mâles de souches DBA2, âgées de 8 semaines. Pour chaque temps de jeûne, une souris dite « à jeun », et une souris contrôle (souris nourrie normalement) ont été sacrifiées. Les temps de jeûne et les numéros des souris correspondantes sont reportés à la figure 4. Pendant la durée du jeûne, les souris avaient accès libre à l'eau. La souris 02S60, dite témoin, a été sacrifiée au début de l'expérience.

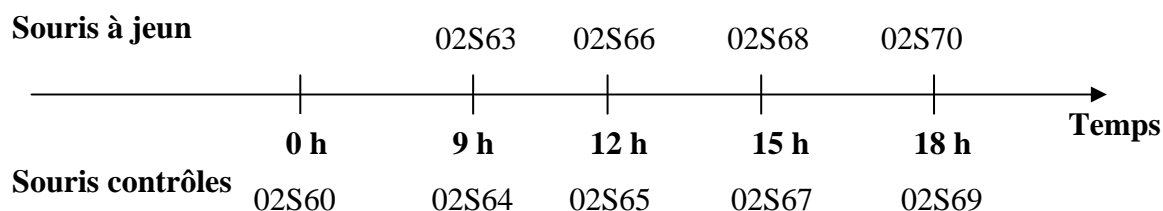


Fig. 4 : Temps de jeûne et numéros des souris à jeun et nourries correspondantes.

Le travail a été effectué à partir de coupes de foies de souris de 10  $\mu\text{m}$ , obtenues par cryosection directement déposées sur la partie effilée de la fibre, sur une longueur d'environ 1 cm.

#### 4.1.2 Analyse des échantillons

La figure 5 représente les spectres IR obtenus à l'aide de la fibre optique, de coupes de foies de souris nourries et à jeun.

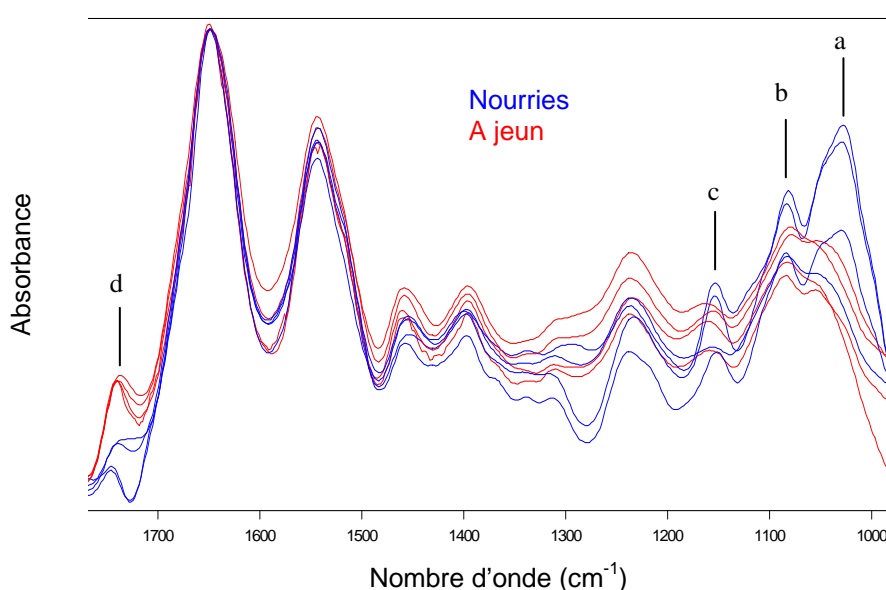


Fig. 5 : Spectres IR des coupes de foies de souris à jeun (9, 12, 15 et 18 h) et nourries, normalisés par rapport à la bande Amide I. (  $a=1026 \text{ cm}^{-1}$ ,  $b=1082 \text{ cm}^{-1}$ ,  $c=1153 \text{ cm}^{-1}$ ,  $d=1741 \text{ cm}^{-1}$  )

#### Anomalies du métabolisme des sucres dans le foie

Le massif de pics compris entre 1200 et 1000  $\text{cm}^{-1}$  sur les spectres de foies de souris à jeun, subit de profondes modifications comparé à ce même massif sur les spectres de foies de souris contrôles. Une forte diminution du pic à 1026  $\text{cm}^{-1}$  (a) est en effet observée. Il est attribué à la vibration de la liaison C-O exocyclique existant dans le glycogène [7]. Les pics à 1082  $\text{cm}^{-1}$  (b) ( C-O endocyclique des cycles du glucose [11]) et 1153  $\text{cm}^{-1}$  (c) (cycle d'oses



complexes [6]) diminuent également. Il est intéressant de constater que la diminution d'intensité de ce massif de pic, est fonction du temps de jeûne.

Le rapport des intensités des pics à  $1082\text{ cm}^{-1}$  (C-O endocyclique du glucose) et  $1026\text{ cm}^{-1}$  (C-O exocyclique du glycogène) a été calculé pour chaque échantillon. Les résultats sont reportés à la figure 6. La valeur de ce rapport permet de séparer les deux populations de souris.

Les souris à jeun ont toutes un rapport supérieur à 1, contrairement à celui des souris contrôles. Ceci implique que l'intensité du pic à  $1026\text{ cm}^{-1}$  caractéristique du glycogène est plus faible comparée à celle du pic à  $1082\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique du glucose. Ce rapport est donc un bon indicateur de la glycogénolyse (dégradation du glycogène) dans le foie en période de jeûne. Notons que la valeur de ce rapport pour la souris témoin 02S60, est lui aussi supérieur à 1. Cette souris a été sacrifiée en fin de journée, après une phase de sommeil, elle n'a probablement pas mangé avant d'être sacrifiée.

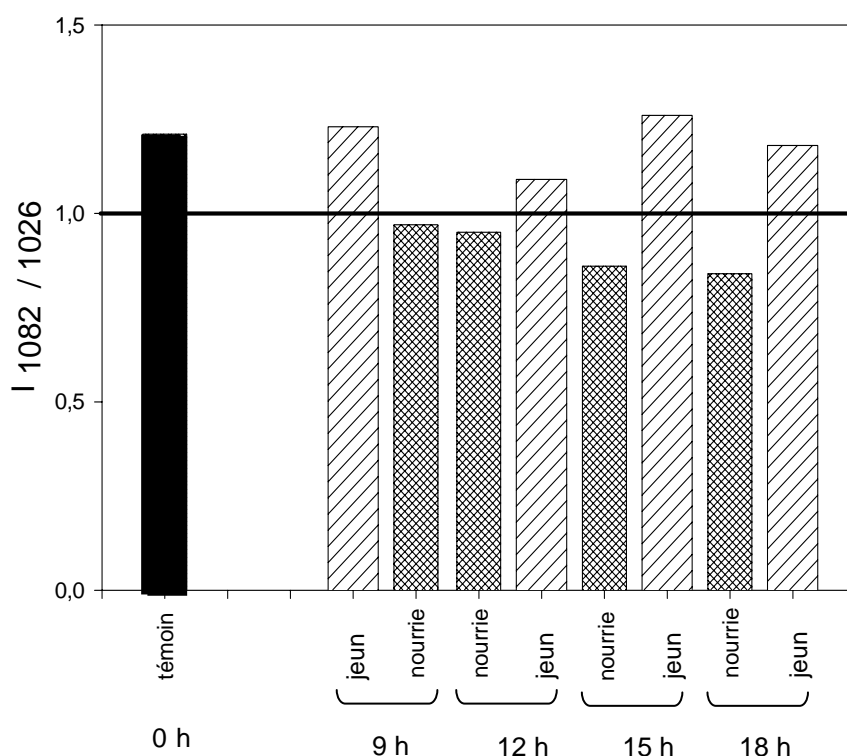


Fig. 6 : Rapport des intensités entre les pics à  $1082\text{ cm}^{-1}$  et  $1026\text{ cm}^{-1}$ , calculé à partir des spectres de coupes de foies de souris nourries et à jeun.

### Anomalie du métabolisme des Lipides

L'étude des dérivées secondes des spectres IR montre, dans la région 3000 à 2800  $\text{cm}^{-1}$ , d'une part une quantité de lipides plus importante pour les souris à jeun et, d'autre part, un décalage en nombre d'onde témoignant de modifications structurales des lipides (Fig. 7).

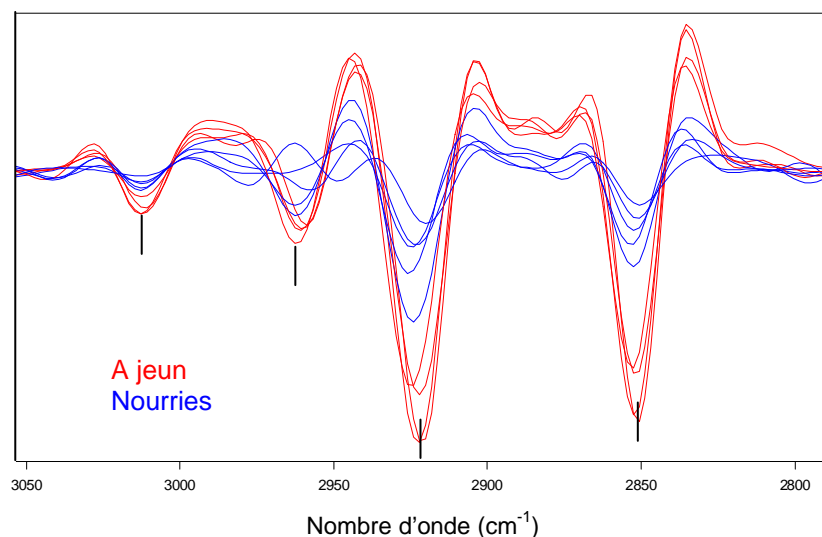


Fig. 7 : Dérivées secondes des spectres de coupes de foies de souris à jeun.

Le pic à 3012  $\text{cm}^{-1}$  est plus intense, il est attribué aux vibrations de liaison = CH contenue dans les lipides. Le pic à 1741  $\text{cm}^{-1}$  (d) (Fig. 5) indique plus précisément qu'il ne s'agit pas d'acides gras libres mais plutôt de lipides estérifiés de type di- et/ou tri- glycérides. Cependant, l'intensité de la bande étant relativement faible, il s'agit que d'une légère stéatose, bien moindre que celle observée chez les souris obèses. D'ailleurs, les colorations histologiques (Fig. 8) ne révèlent que de petites gouttelettes rouge-orange dans les hépatocytes, traduisant une faible teneur en lipide neutre sur les coupes de foies de souris à jeun.

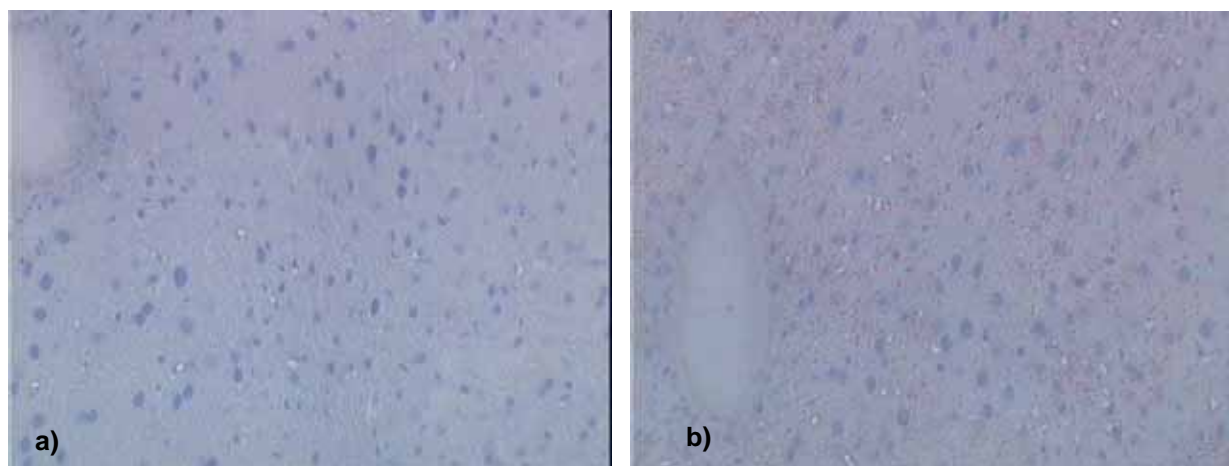


Fig. 8 : Coloration à l'huile rouge d'une biopsie de foie de souris DBA2 a) nourrie et b) à jeun (15 h). La stéatose est visualisée sous forme d'inclusions hépatocytaires rouges (agrandissement original X 400).

La position des bandes des lipides dépend de leur structure et environnement [12]. Ainsi, de précédentes études ont montré la relation existant entre la position des bandes situées autour de  $2920\text{ cm}^{-1}$  et  $2850\text{ cm}^{-1}$  (vibration  $\text{CH}_2$  asymétrique et symétrique des lipides) et la fluidité des membranes [9].

Dans notre cas, la bande située autour de  $2924\text{ cm}^{-1}$  sur les spectres de foies de souris nourries, se décale de  $4\text{ cm}^{-1}$  vers de plus bas nombres d'onde sur les spectres de foies de souris à jeun. De même, la bande à  $2853\text{ cm}^{-1}$  se décale à  $2851\text{ cm}^{-1}$ . Le tableau I rassemble les positions de ces bandes, obtenues d'après les dérivées secondes des spectres.

Souris nourries					Souris à jeun			
t = 0 h	t = 9 h	t = 12 h	t = 15 h	t = 18 h	t = 9 h	t = 12 h	t = 15 h	t = 18 h
2925	2923	2919	2924	2924	2924	2923	2921	2920
2853	2852	2852	2852	2853	2853	2851	2851	2851

Tableau I : Valeurs en nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ), de la position des bandes caractéristiques des vibrations  $\text{CH}_2$  asymétrique et symétrique des lipides.

Ces résultats semblent indiquer que pour une période de jeûne assez importante (au moins 12h), il se produit un changement de structure des lipides de la membrane cellulaire. Le jeûne semble avoir un effet sur les constituants lipidiques (longueur de chaîne, insaturation des acides gras des phospholipides) ce qui induit des variations de la micro-viscosité membranaire [9].

#### 4.1.3 Métabolisme dans le foie au cours d'un jeûne

Lorsque l'alimentation est normale, le foie stocke le glucose sous forme de glycogène. C'est le principal mode de mise en réserve des glucides chez les animaux. Il est présent principalement dans le foie et le muscle [13]. Dans le foie, la fonction essentielle du glycogène est d'être au service d'autres tissus, en participant au maintien de la glycémie. Dans le cas d'un jeûne, il faut que la glycémie (taux de glucose dans le sang) soit maintenue pour permettre à tous les organes en particulier le cerveau, de continuer à fonctionner normalement.

Un des phénomènes entrant en jeu, est la glycogénolyse. Le glucose stocké dans le foie sous forme de glycogène (Fig. 9), est libéré et rejoint la voie sanguine [14].

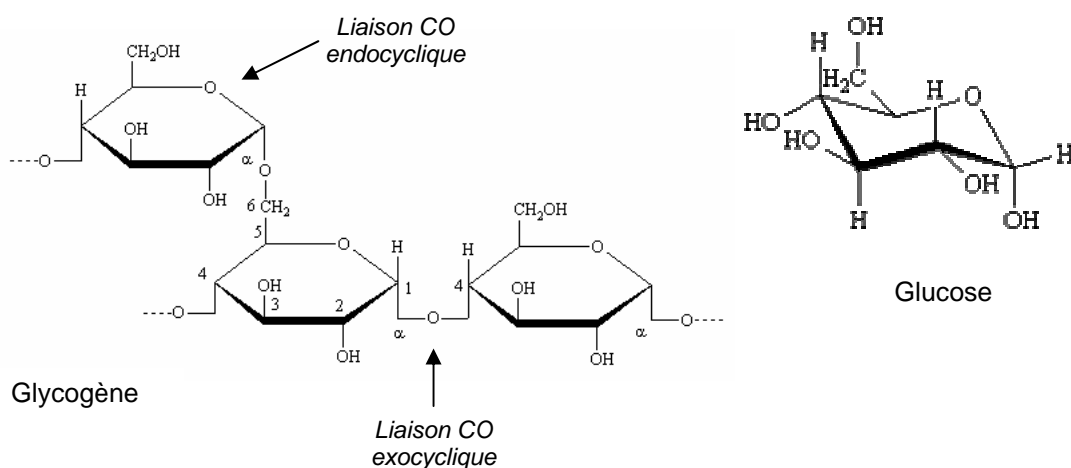


Fig 9 : Le glucose et son polymère, le glycogène.

Dans notre étude, ce phénomène est mis en évidence, sur les spectres IR, par la diminution en intensité du massif de pics compris entre 1200 et 1000  $\text{cm}^{-1}$  et par le résultat du rapport d'intensité 1082  $\text{cm}^{-1}$ /1026  $\text{cm}^{-1}$ . La glycogénolyse hépatique intervient rapidement et se trouve en première ligne pour maintenir la glycémie et ainsi, fournir l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de tous les organes.

L'action de la glycolyse permet de subvenir aux besoins en glucose de l'organisme d'un sujet moyen pendant environ 4h. En outre, ceci est une surestimation car les réserves de glycogène dans le foie ne sont jamais complètement épuisées même après un jeûne prolongé.

Normalement, le second phénomène qui entre en jeu pendant une période de jeûne, est la lipolyse [14], qui consiste en la dégradation de triglycérides, en trois acides gras et une molécule de glycérol (Fig. 10).

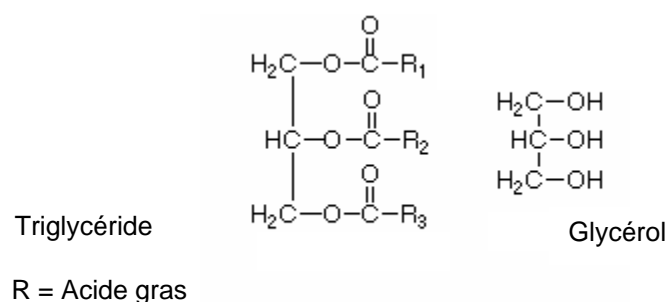


Fig. 10 : Formule générale d'un triglycéride et du glycérol.

Ces molécules relarguées par le tissu adipeux, vont jusqu'au foie. Le glycérol est transformé en glucose. Ainsi, pendant un jeûne, le glycérol libéré par la dégradation des triglycérides dans les tissus adipeux, constitue une source importante de glucose. Le foie dégrade aussi les acides gras en corps cétoniques qui sont ensuite libérés dans le sang. Ils fournissent au cours du jeûne, une source importante d'énergie à des tissus capables de les oxyder. Ceci permet, à l'organisme, d'économiser du glucose nécessaire au fonctionnement du cerveau.

Il n'y a donc, a priori aucune raison de trouver un taux de triglycérides plus important dans les foies de souris à jeun. Cependant, des études réalisées sur les conséquences du jeûne chez les souris balb/c et C57BL/6, ont montré également un taux de triglycérides plus

important dans les foies de souris à jeun [15]. D'après la littérature, les conséquences d'un jeûne sur le métabolisme hépatique sont fonction de l'animal considéré [16], sa taille [17], de même que l'âge et le sexe [18].

C'est pourquoi, la présence de triglycérides dans les foies de souris à jeun, n'est pas encore bien comprise. Il semble cependant, que le métabolisme de la souris soit légèrement différent de celui trouvé chez de nombreux mammifères en période de jeûne.

Notons cependant, qu'il est connu chez l'homme, qu'une sous-alimentation sévère, notamment un déficit en protéine, peut conduire à une stéatose hépatique [19].

#### 4.2 Influence du fond génétique face à un jeûne de 12h

Lorsque l'on travaille sur des modèles animaux, il ne faut pas négliger la variabilité de fond génétique qui existe entre les souches. Pour rendre compte de cette variabilité, nous avons placé en restriction alimentaire deux souches différentes de souris mâles (DBA2 et Balb/c) pendant 12 h.

Pour cette étude, nous avons travaillé sur coupes de foie de 10  $\mu\text{m}$ . Pour chaque échantillon de tissu prélevé sur des souris nourries ou à jeun, des analyses histochimiques et IR en transmission ont été réalisées pour contrôle.

La figure 11 montre les spectres de foies de souris nourries et à jeun, obtenus à l'aide de la fibre optique, pour chacune des deux souches.

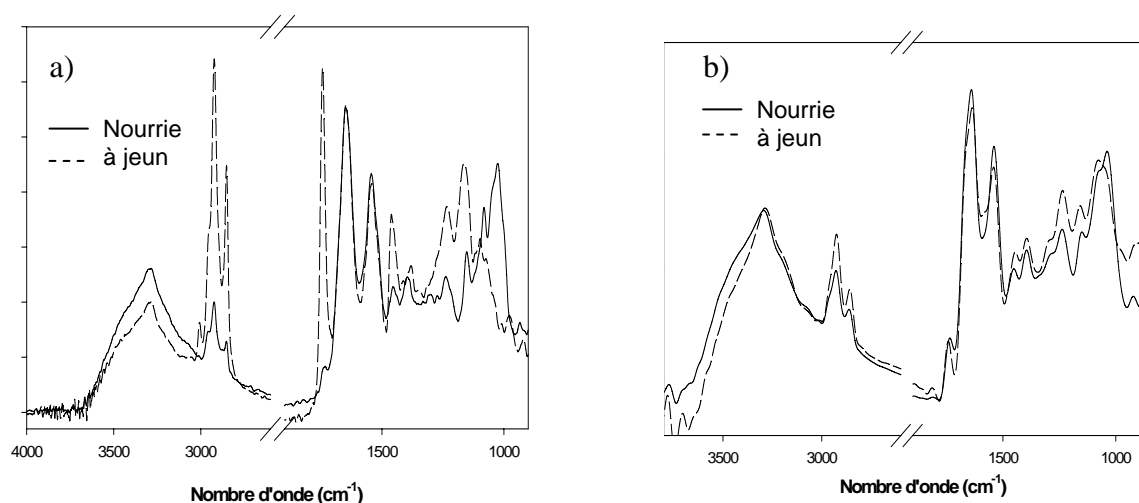


Fig 11 : Spectres IR des coupes de foies a) de souris balb/c, b) de souris DBA2.

Les analyses spectrales montrent les mêmes variations et aboutissent aux mêmes conclusions que celles mises en évidence pour l'étude temporelle du jeûne (paragraphe 4.1.2). En effet, on retrouve une diminution des bandes caractéristiques des sucres et la présence de triglycérides dans les foies de souris à jeun. Cependant, l'ampleur des variations spectrales est très différente d'une souche à l'autre. Pour la souche Balb/c, les différences spectrales entre les foies de souris nourries et à jeun sont très importantes. Notamment, les pics attribués aux lipides (région  $2700-3000\text{ cm}^{-1}$ ) et aux triglycérides ( $1745$  et  $3011\text{ cm}^{-1}$ ) voient leur intensité fortement augmentée. Ces résultats sont en accord avec les colorations à l'huile rouge qui montrent une forte stéatose hépatique chez ces souris. De même, les bandes des sucres ( $1100-900\text{ cm}^{-1}$ ) voient leur intensité fortement diminuée par rapport au spectre de foie de souris nourries.

Bien que moins marquées, les variations misent en évidence sur les spectres de coupes de foies de souris DBA2 à jeun et nourries, sont les mêmes.

#### 4.3 Conclusion sur l'étude des conséquences d'un jeûne

L'étude des conséquences de différents temps de jeûne sur les constituants cellulaires du foie par spectroscopie IR à l'aide de la fibre optique, permet de mettre en évidence la dégradation du glycogène dans le foie au cours du temps, ainsi qu'une augmentation du contenu en triglycérides. Les variations spectrales peuvent être reliées aux événements métaboliques entrant en jeu dans une période de jeûne. Même s'il n'est pas possible de déterminer une cinétique de consommation du glucose, pendant la phase de jeûne, l'intensité des bandes étant fonction de la concentration, il est possible de classer les spectres en fonction du temps de jeûne. Ces résultats sont en accord avec les données biologiques et sont équivalents à ceux obtenus par spectroscopie en transmission de ces mêmes échantillons.

D'après l'étude des conséquences d'un jeûne de 12 h sur deux souches différentes, il semblerait que le fond génétique influence la réponse métabolique face à un jeûne. Ceci n'est pas unique ; on peut citer, par exemple, l'influence du fond génétique sur le métabolisme hépatique du fer [20]. Cette expérience montre ainsi la capacité de cette technique à mettre en évidence des différences du fond génétique entre souches. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus en transmission et avec les colorations histologiques.

## 5. Etude de la surcharge en fer hépatique

### 5.1 La surcharge en fer

Le fer joue un rôle fondamental dans l'organisme. Il représente en effet, un élément essentiel intervenant dans de nombreuses réactions biologiques. Dans l'organisme, le fer n'existe pas à l'état libre. Il est complexé à des protéines appelées ferroprotéines telles que, l'hémoglobine ou la myoglobine.

Certaines pathologies conduisent au développement d'une surcharge dans certains organes, dont le foie, qui est le principal site de stockage du fer. Un excès de fer peut conduire au développement de complications graves (cirrhose et/ou cancer du foie) [21].

La forme de stockage du fer dans les cellules est le fer-ferritine. La ferritine forme une véritable coque protéique à l'intérieure de laquelle jusqu'à 4500 atomes de fer peuvent être stockés [22]. Lors d'une surcharge en fer, le contenu cellulaire en ferritine augmente de façon très importante, [23] ce qui permet de stocker le fer sous une forme chimiquement inactive.

### 5.2 Mode opératoire

A travers l'analyse de coupes de foies surchargés en fer, nous cherchons à évaluer le potentiel de la spectroscopie par fibre, dans la détection de variations spectrales au niveau des bandes des protéines. En effet, la ferritine est une grosse protéine composée de 24 sous-unités en hélice  $\alpha$  [24]. En spectroscopie IR, la position des bandes dépend non seulement de la nature de la molécule, mais aussi de son environnement. Ainsi, la structure des protéines peut être déterminée par la position des bandes Amides I et II.

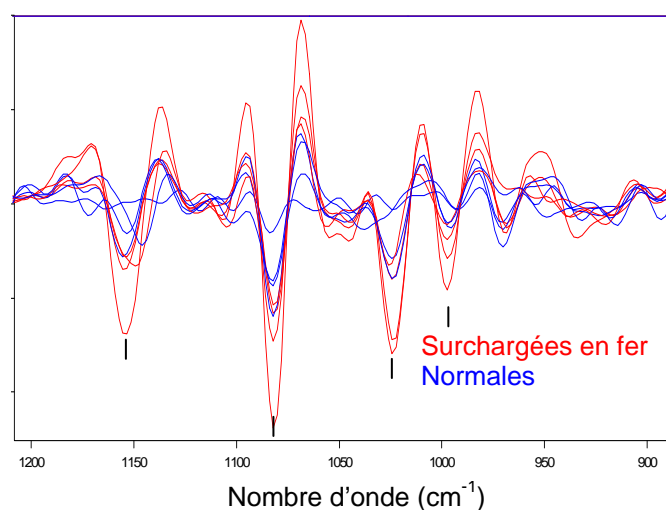
L'étude a été réalisée sur 2 lots de souris mâles Balb/c âgées de 7 semaines. Les spectres ont été enregistrés à partir de coupes de foie de 10  $\mu\text{m}$ . Les 4 souris appelées « surchargées en fer », correspondent aux souris 02S51, 53, 55 et 57. Elles ont toutes reçu une injection sous cutanée d'une solution de Fer-Dextran (complexe ferrique hydroxyde-dextran, 0,5 % phénol ; Sigma France) à 100 mg de fer/ml avec une proportion de fer de 1 mg de fer par gramme de poids corporel [25]. Les 4 souris contrôles ont reçu une injection sous-cutanée de phénol-dextran dans les mêmes proportions que les souris surchargées. Elles correspondent



aux souris 02S50, 52, 54 et 56. Elles ont toutes été sacrifiées 2 mois après leur inclusion dans le travail.

### 5.3 Analyse des échantillons

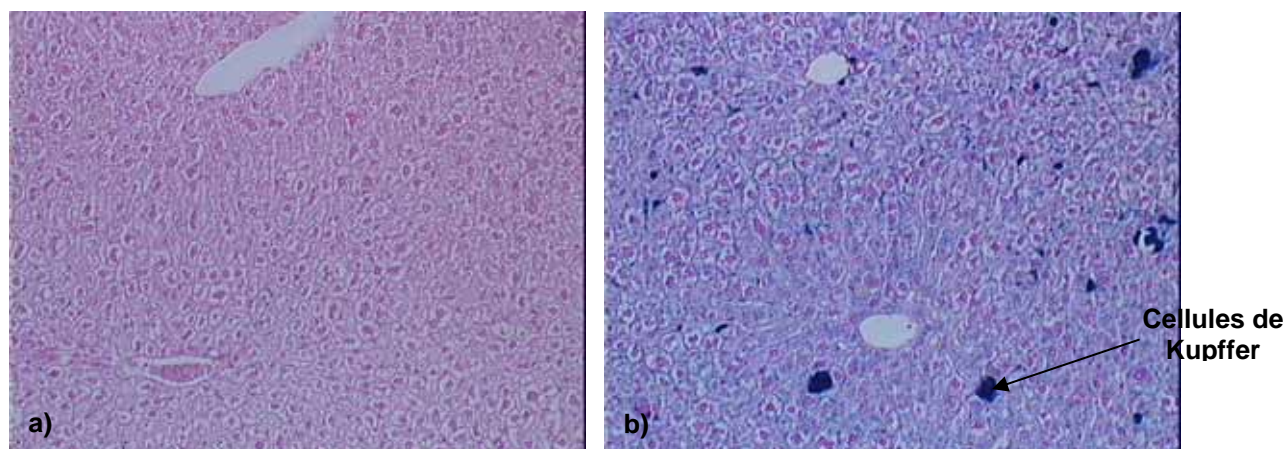
L'étude spectrale directe des coupes de foies de souris surchargées et normales, ne permet pas de différencier les deux groupes de souris. Il est nécessaire de recourir à l'analyse des dérivées secondes (Fig. 12) pour affiner l'information sur les modifications du métabolisme. Seule la région comprise entre 1200 et 900  $\text{cm}^{-1}$  montre des différences significatives entre les deux groupes de spectres. En effet, dans cette région, une augmentation des pics caractéristiques des molécules de sucres est détectée, suggérant une augmentation du contenu en glycogène.



*Fig. 12 : Dérivées secondes des spectres de coupes de foies de souris surchargées en fer et normales.*

Par contre, les bandes amides I et II ne sont pas affectées : aucun déplacement spectral, pouvant être attribué à une synthèse accrue de ferritine, n'est mis en évidence. Les colorations de Perl's ont pourtant révélé une surcharge en fer (Fig. 13). Le spectre de la ferritine pure donne notamment deux pics intenses à 1650  $\text{cm}^{-1}$  (Amide I) et 1545  $\text{cm}^{-1}$  (Amide II) [26], et

ils ne sont pas détectés sur les spectres de foie de souris surchargées, de même que sur les dérivées secondes de ces spectres.



*Fig. 13 : Colorations de Perl's des coupes de foies de souris balb/c a) contrôles et b) surchargées en fer. La surcharge est visible sous forme d'une coloration bleutée dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer (agrandissement original X 200).*

Concernant les pics caractéristiques des lipides, aucune différence significative n'est constatée. L'analyse des spectres en transmission de ces mêmes échantillons ne permet pas de tirer d'autres conclusions.

## 5.4 Discussion

Il n'a pas été possible de détecter de variation du profil spectral des protéines. Cependant, il est à noter que les bandes Amides I et II représentent la signature globale de toutes les protéines présentes dans le foie. Les variations dues à la ferritine se retrouvent noyées parmi toutes les bandes des autres protéines. Une augmentation du taux de sucres a été mise en évidence.

Cette expérience montre les limites de caractérisation de cette méthode d'analyse. Les anomalies du métabolisme des protéines sont difficilement détectables si celles-ci ne concernent qu'une seule protéine en particulier. Cependant, on peut espérer obtenir de meilleurs résultats quand l'altération métabolique affecte plusieurs types de protéines.

## 6. Conclusion

Le biocapteur a été testé sur trois modèles animaux (l'obésité, le jeûne et la surcharge en fer) induisant des variations du métabolisme hépatique. L'analyse spectrale conduit à des résultats équivalents à ceux trouvés en spectroscopie IR en transmission, et sont en accord avec les données biologiques.

Ce travail montre les possibilités mais aussi les limites de cette technique dans l'analyse d'un tissu biologique.

Tout d'abord, malgré la forte teneur en eau des tissus frais, il est possible de déterminer et caractériser des différences spectrales reliées à un dysfonctionnement du métabolisme des glucides et des lipides dans le foie de souris obèses.

De même, l'analyse à partir de biopsies de foie, permet clairement de détecter une anomalie du métabolisme. Ainsi, pour l'étude du jeûne de différentes durées, cette technique est assez sensible pour permettre le classement des spectres en fonction de la durée du jeûne.

Cependant, les analyses quantitatives sont difficiles avec la configuration actuelle de la fibre. L'intensité dépend de la longueur de contact fibre/échantillon, et il est techniquement difficile de garder celle-ci constante. La mise en forme du senseur reste un point à améliorer.

De même, il n'a pas été possible de détecter des variations spectrales significatives lorsque la fibre était en contact avec la capsule de Glisson. L'épaisseur de cette structure est supérieure à la profondeur de pénétration (1  $\mu\text{m}$ ) de l'onde évanescente.

Dans le cas de la surcharge en fer, nous n'avons pas pu détecter d'augmentation de la quantité de fer dans le foie via une augmentation de la synthèse en ferritine, du fait de la complexité du spectre du foie. Il n'est pas possible de détecter une modification du métabolisme d'une seule protéine.

Cette technique possède, malgré tout, un potentiel intéressant pour des applications en médecine. Il est en effet possible de détecter et de caractériser des variations spectrales liées à des modifications du métabolisme des lipides et des sucres, dans un tissu, permettant d'orienter le diagnostic.

## RÉFÉRENCES

- [1] E. Martin et G. Feldmann, *Histopathologie du foie et des voies biliaires*, Ed. Masson, Paris, (1983), 9.
- [2] R. Hould, *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*, 5<sup>ème</sup> Ed., Decarie, Montréal, (1988), 400.
- [3] M.A. Pelley, M.J. Cullen, M.B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, F. Collins, *Science*, (1995), jul. 28, 269(5223), 540-3
- [4] Y. Zang, R. Proenca, M. Maffei, et al., *Nature*, (1994), 372, 425-432.
- [5] P. Zimmet, G.R. Collier, *MJA*, (1996), 164, 393-394.
- [6] M. Jackson, H.H. Mantsch. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Ed. Mantch H.H., D. Chapman, New York, Wiley-Liss, (1996), 208-209 et 226.
- [7] P.T.T. Wong, R.K. Wong, T.A. Capulo, T.A. Godwin, B. Rigas., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1991) December, Vol. 88, 10988-10992.
- [8] D. Bertrand et D. Dufour, « *La spectroscopie et ses applications analytiques* », Ed. Tec et Doc, Paris (2000), 150.
- [9] K.Z. Liu, R. Bose, H.H. Mantsch, *Vibrational Spectroscopy*, (2002), 28, 131-136.
- [10] W.K. Surewicz, H.H. Mantsch, D. Chapman, *Biochemistry*, (1993), Vol. 32, N°2, , 389-394.
- [11] T. Uemura, K. Nishida, M. Sakakida, K. Ichinose, S. Simoda, M. Shichiri, *Frontiers Med. Biol. Engng*, (1999), Vol. 9, No. 2, 137-153
- [12] H.L. Casal, H.H. Mantsch, *Biochem. Biophys. Acta*, (1984), 779, 381.
- [13] R.K. Murray, D.K. Graner, P.A. Mayers, V.W. Rodwell, *Harper's Biochemistry 24<sup>th</sup> edition*, Appleton & Lange, A Simon & Schuster company (1996), 185.

- [14] A.J. Vander et al., *Physiologie Animal, 3eme Edition*, MacGraw-Hill, Chendière, Montréal, (1995).
- [15] R.C. Leboeuf, M. Caldwell, E. Kirk, *J. Lipid Res.*, (1994) jan., 35(1), 121-33
- [16] L.A. Menahan K.A. Sobocinski, *Comparative biochemistry and physiology part B : Biochemistry and Molecular Biology*, (1983), Vol. 74, Issue 4, 859-864.
- [17] D. Bauchart, D. Durand, D. Gruffat-Mouty, C. Piot, B. Graulet, Y. Chilliard, J.F. Hocquette, *INRA Prod. Anim*, (1999), 12, 273-285.
- [18] T. Hashimoto, W.S. Cook, C. Qi, A.V. Yeldandi, J. K. Reddy, S. Rao, *J. Biol. Chem.*, (2000), Vol. 275, N°37, Issue of September 15, 28918-28928
- [19] J.S. Whittaker, U.P Steinbaker, M. Lemoyne, H.J Freeman, *Principes fondamentaux de gastro-entérologie : Etats pathologiques et démarches thérapeutiques*, 3ème Ed., ABR Thomson, A. Archambault, E.A. Shaffer, Edmonton, (1992), 56-77.
- [20] R.C Leboeuf, D. Tolson, J.W. Heinecke, *J. Lab. Clin. Med.*, (1995), Aug., 126(2), 128-36.
- [21] C. Niedereau, R. Fisher, A. Purshel, W. Stermel, D. Hussinger, G. Strohmeyer, *Gastroenterology*, (1996) Apr., 110 (4), 1107-19.
- [22] H.N Munroand M.C Linder, *Physiol. Rev.* (1978), 58, 317-96.
- [23] J. Zarhinger, B.S. Baliga, H.N Munro, *Poc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1976), 73, 857-61.
- [24] N. D. Chesteen and P.M. Harison, *Journal of structural Biology*, (1999), Vol. 126, p.182-194.
- [25] P. Carthew, R.E. Edwards, A.G. Smith, B. Dorman, J.E. Francis, *Hepatology*, (1990), Vol. 13, N°3, 534-539.
- [26] I. Yamashita, *Thin Solid Films*, (2001), 393, 12-18.

## CHAPITRE IV

### APPLICATION EN BIOLOGIE

#### ANALYSE D'UN FLUIDE

## 1. Introduction

Les tissus de l'organisme et les cellules qui les composent, ont notamment besoin pour fonctionner d'un apport d'oxygène, d'éléments nutritifs et de messagers (immunologiques, chimiques). C'est le sang qui assure ce rôle de transport. De même, il recueille et conduit aux organes éliminateurs (reins, peau, poumons) les produits du catabolisme cellulaire. Le sang remplit donc de nombreuses tâches nécessaires au maintien de la vie. Toutes perturbations du métabolisme d'un organe peut entraîner des modifications de son contenu. Les dosages sanguins présentent donc un grand intérêt pour l'identification d'une pathologie. Une simple prise de sang permet en effet, l'accès à une information très riche.

Le sang est un tissu fluide circulant dans les vaisseaux [1]. Il est constitué d'une phase liquide riche en sels minéraux et protéines, le plasma, et d'une phase cellulaire. Les cellules sont de trois types : les plaquettes, les globules rouges et les leucocytes. Le plasma est un liquide jaune pâle, correspondant à la fraction du sang qui ne contient pas de cellules sanguines. En très grande partie constitué d'eau (92%), il contient encore : des enzymes, des hormones, des protides, des sels minéraux, des produits des métabolismes cellulaires (urée, bilirubine,...) etc.... Il contient également des facteurs de coagulation. C'est en faisant coaguler le sang qu'est obtenu le sérum.

Le sérum contenant de nombreux éléments biochimiques, est une source inépuisable d'informations et, le plus souvent, les examens biologiques effectués après une prise de sang le concernent. C'est pourquoi, nous avons cherché dans ce chapitre à caractériser dans le sérum les signatures infrarouges d'anomalies métaboliques, liées à une pathologie, sur des modèles animaux et au cours de pathologies humaines.

En spectroscopie MIR, l'étude d'un fluide biologique pose le problème de la forte contribution de l'eau au signal recueilli. Pour palier ce problème, et avoir accès à des données quantitatives, nous avons introduit un étalon interne dans les sérums, en concentration connue dont la bande d'absorbance nous a servi à normaliser les spectres. Ce protocole a été testé sur trois états métaboliques : l'obésité, le jeûne et la surcharge en fer.

Puis, nous avons testé une méthode d'analyse statistique, sur des sérums humains provenant de patients : l'analyse en composantes principales ou ACP. Cette méthode non-supervisée, permet une analyse rapide d'échantillons, par comparaison avec une banque de spectres de références.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Olivier Loréal, de l'Unité 522 de l'INSERM de Rennes, et le Pr. Pierre Brissot du service des Maladies du Foie (CHU, Rennes).

## 2. Prélèvement et analyses biochimiques des échantillons

Concernant les analyses sur sérums de souris, les prélèvements ont été réalisés sur des souris anesthésiées. Après un prélèvement intra-cardiaque, le sang est mis à coaguler. Le sérum récupéré après une brève centrifugation (3500 *rpm* pendant 10 min.) est stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les dosages biochimiques sériques ont été réalisés dans le laboratoire de Biochimie Générale et Enzymologie du CHRU de Rennes (Dr. Martine Ropert), en utilisant un automate (Cobas Mira). La glycémie, le cholestérol total, le HDL cholestérol et les triglycérides ont été dosés à l'aide des trousses RTU (Biomérieux). Le LDL cholestérol a été déduit d'après la formule de Friedewald (IV-1) [2].

$$\text{Cholestérol LDL} = \text{Cholestérol total} - \text{HDL} - \text{Triglycérides} / 2,2 \quad (\text{IV-1})$$

La collecte des sérums humains utilisés dans ce travail a été réalisée dans le cadre d'une étude des anomalies sériques liées au métabolisme du fer au cours de maladies hépatiques. Cette étude a reçu l'agrément du CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale) de Rennes.

Afin de respecter la législation concernant la manipulation de matériel biologique humain, les mesures spectrales ont été réalisées à l'Unité 522 de l'INSERM de Rennes.



### 3. Spectroscopie en milieu liquide

Dans le chapitre II, nous avons vu comment la longueur de contact fibre/échantillon influençait l'absorbance. En milieu liquide, ce paramètre est difficile à calibrer dans la configuration actuelle de la fibre. En effet, même si l'on dépose toujours la même quantité de sérum à analyser, le contact fibre/goutte de sérum n'est jamais strictement le même. Ainsi, il existe des variations d'absorbance liées aux conditions expérimentales et non à une variation de concentration d'un ou plusieurs éléments contenu dans le liquide analysé. Ceci peut donc entraîner des erreurs dans l'analyse des spectres.

Les fluides biologiques, tel que le sérum, sont constitués de beaucoup d'eau. Le domaine spectral  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la liaison peptidique (Amide I), présente l'inconvénient d'être également un domaine de forte absorbance de l'eau. A l'état liquide, l'eau présente un maximum d'absorption à  $1636\text{ cm}^{-1}$  (voir Chapitre II) qui masque la bande Amide I des protéines. Il existe des méthodes de soustraction du spectre de l'eau liquide [3 ; 4], cependant elles peuvent amener à des erreurs d'interprétation, car elles sont souvent subjectives. Par exemple, l'utilisation de différentes méthodes de soustraction peut conduire à des résultats de spectres corrigés différents, pour une même protéine [5 ; 6].

De plus, lors de la soustraction, il faut tenir compte du fait que les molécules d'eau interagissent avec les biomolécules, ce qui entraîne des déformations du spectre de l'eau [7]. Enlever la contribution de l'eau sur le spectre d'un fluide biologique, est donc une opération délicate, difficile à maîtriser.

Pour palier à ces deux problèmes et tenter de réaliser des études quantitatives, nous avons testé l'introduction d'un étalon interne en concentration connue dans les sérums à analyser, afin de normaliser les spectres.

## 4. Introduction d'un étalon interne

### 4.1 Choix de l'étalon

Le choix de l'étalon s'effectue en fonction du milieu à analyser. Dans notre cas, l'introduction d'un étalon interne dans le sérum, milieu biologique complexe, ne doit en aucun cas, modifier la structure des biomolécules. Il est évident que dans le cas contraire, une interaction étalon/biomolécule, entraînerait des modifications spectrales qui ne seraient pas dues à un dysfonctionnement du métabolisme. Des erreurs d'analyses pourraient alors se produire. De plus, le spectre MIR du sérum étant complexe, il est souhaitable que la ou les bandes d'absorption de l'étalon choisi, ne se situent pas à un endroit riche en signatures spectrales des molécules d'intérêt pour nos études.

Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation d'une molécule chimique, le thiocyanate de potassium (KSCN). Cette molécule possède une raie unique, dans le MIR, se situant à  $2060\text{ cm}^{-1}$  (vibration de l'ion  $\text{SCN}^-$ ) [8]. Cette absorption permet de normaliser les spectres de sérum, en compensant les variations aléatoires de longueur de contact. La figure 1 représente le spectre MIR d'une solution de KSCN à 60 mg/ml, obtenu par fibre optique. Rappelons que la bande à  $1636\text{ cm}^{-1}$ , est attribuée à la vibration des liaisons OH de l'eau.

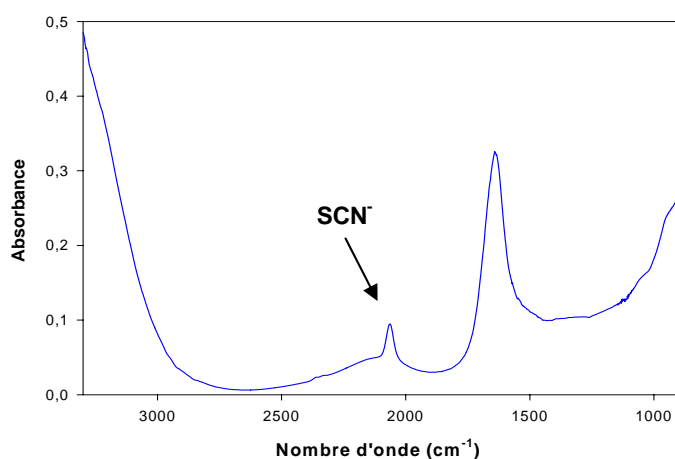


Fig. 1 : Spectre MIR d'une solution de thiocyanate de potassium à 60 mg/ml.

De plus, l'introduction d'un volume de KSCN en solution, n'altère en rien l'allure du spectre de sérum (Fig. 2). Les molécules de KSCN n'interagissent pas avec les biomolécules.

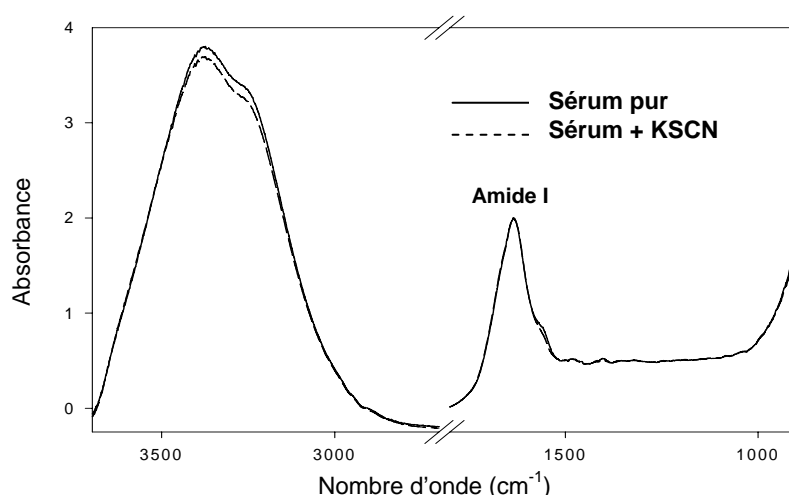


Fig 2 : Spectres IR de sérum pur de souris et d'une solution 50/50 de ce même sérum avec KSCN. Les spectres sont normalisés par rapport à la bande Amide I.

Notons que le pH du KSCN dilué dans de l'eau distillée est neutre ( $\approx 7$ ), pH compatible avec les milieux biologiques étudiés.

## 4.2 Mise au point du protocole expérimental

Lors des premières analyses de sérum de souris, deux types de spectres ont été enregistrés :

- La fibre optique en contact direct avec le sérum (spectre dit « fibre en contact »).
- Après immersion de la fibre optique, dans le sérum (spectre dit « fibre relevée »).

La comparaison des deux spectres (Fig. 3), montre qu'il est plus intéressant de travailler à partir des spectres dits « fibre relevée » qu'à partir de ceux dits « fibre en contact ». En effet, sur ces derniers, la contribution de l'eau est très importante et masque les bandes d'absorption des biomolécules du sérum. L'interprétation est dans ce cas, plus difficile. C'est pourquoi, nous avons choisi, pour ces études, de travailler à partir des spectres enregistrés la « fibre relevée », c'est-à-dire, à partir de ceux obtenus après immersion ponctuelle de la fibre dans le sérum. Du fait de la plus faible contribution des molécules d'eau, les bandes d'absorption des

molécules d'intérêt y apparaissent plus clairement, et le pic de  $\text{SCN}^-$  étant plus intense, la normalisation sera de meilleure qualité.

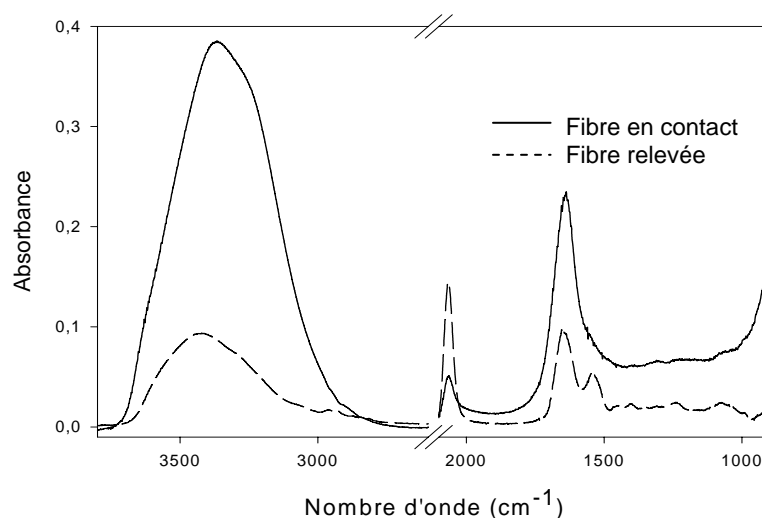


Fig. 3 : Spectres IR de sérum de souris avec KSCN, fibre en contact et fibre relevée.

Pour nos études, une solution mère de KSCN à 60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  diluée dans de l'eau distillée, a été préparée. Puis 10  $\mu\text{l}$  de cette solution ont été ajoutés au même volume du sérum analysé. Les spectres ont été enregistrés en déposant 10  $\mu\text{l}$  de solution KSCN/sérum, en contact avec la partie senseur de la fibre optique. Pour chaque échantillon, un spectre « fibre en contact » puis, « fibre relevée », ont été enregistrés. De même, des spectres de sérum pur (sans KSCN), la fibre en contact et relevée, ont également été enregistrés, pour comparaison. Après chaque mesure, la fibre est nettoyée abondamment à l'eau distillée, et séchée à l'air. Puis, un spectre référence, à l'air, est enregistré afin de s'affranchir des éventuels résidus de sérum et/ou eau qui seraient restés adsorbés sur la fibre.

Après avoir démontré l'intérêt de la normalisation par rapport à l'intensité du pic du KSCN, nous avons testé ce protocole sur trois modèles :

- Sérum de souris obèses
- Sérum de souris à jeun
- Sérum de souris surchargées en fer

Les spectres ont tous été enregistrés avec une résolution spectrale de 4  $\text{cm}^{-1}$  et une co-addition de 100 scans.

### 4.3 Première approche : intérêt de la normalisation

Dans une première approche, nous nous sommes assurés de l'effet de la normalisation par rapport au pic de  $\text{SCN}^-$ , en comparant des spectres de sérum de souris ayant subi un jeûne de 12 h, avec ceux de souris nourries.

Pour cette étude, six souris mâles DBA2, toutes âgées de 8 semaines ont été utilisées. Trois d'entre elles ont subi un jeûne de 12 h, les trois autres ont été nourries normalement. La figure 5 montre les spectres obtenus, avant et après normalisation par rapport au pic de  $\text{SCN}^-$ . Avant la normalisation (Fig. 4a), il est impossible de différencier les deux groupes de spectres. Par contre, après normalisation par rapport au pic de  $\text{SCN}^-$  (Fig. 4b), les spectres de sérums de souris nourries se superposent, de même pour ceux des souris à jeun. De plus, une légère différence de niveau d'absorbance est perceptible entre les deux groupes de sérums, qui pourrait être attribuée à l'état physiologique de l'animal.

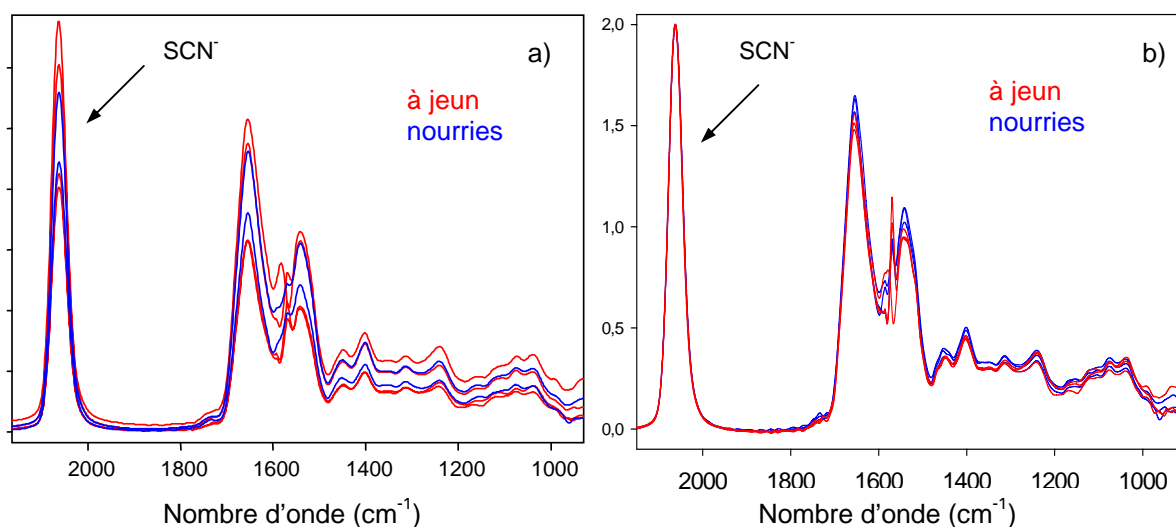


Fig. 4 : Spectres IR des sérums de souris DBA2 nourries et à jeun, a) avant et b) après normalisation par rapport au pic de  $\text{SCN}^-$ .

Cette première approche montre tout l'intérêt de l'utilisation d'un étalon interne dans l'étude du sérum, et plus généralement des fluides biologiques. Des études quantitatives semblent donc envisageables avec cette méthode.

#### 4.4 Les souris obèses

Notre étude s'est portée sur l'analyse de sérum de souris ob/ob. L'étude a été réalisée sur cinq souris mâles ob/ob et cinq souris mâles ob/+. Les caractéristiques de ces souris ont déjà été abordées dans le chapitre III. Il s'agit d'ailleurs, des mêmes animaux que ceux utilisés pour l'étude des foies entiers, c'est-à-dire :

- 02S73, 75, 77 et 79 pour les souris dites normales.
- 02S74, 76, 78 et 80 pour les souris dites obèses.

##### 4.4.1 Analyse des résultats

La figure 5 représente les spectres IR des sérums de souris obèses et normales, obtenus avec la fibre optique, après immersion dans le sérum. Les spectres présentés sont normalisés par rapport au pic du SCN<sup>-</sup>.

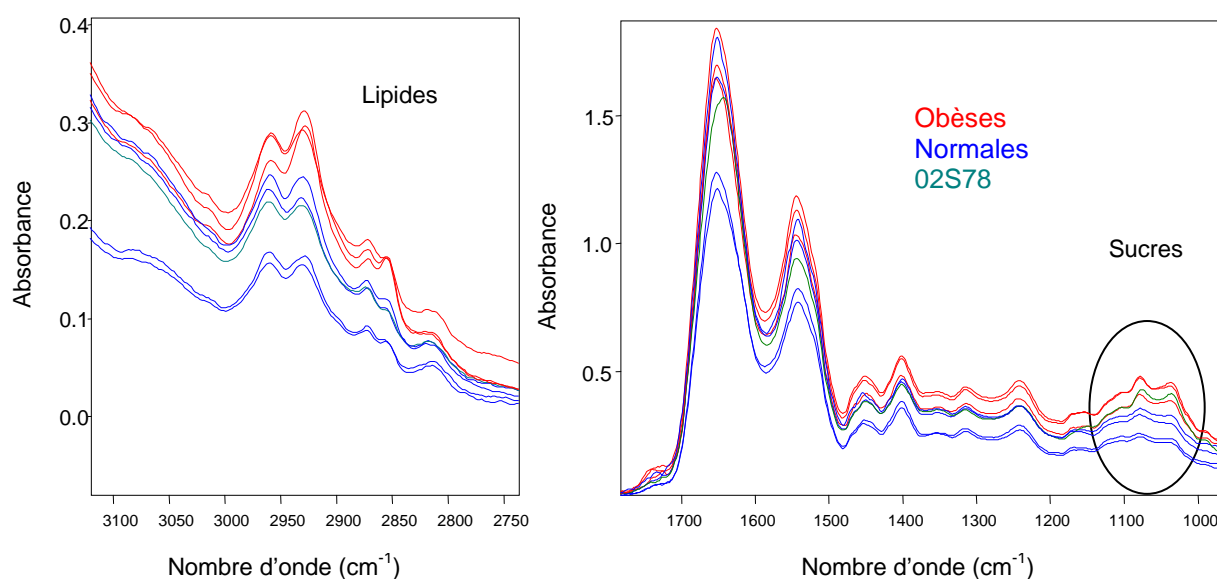


Fig. 5 : Spectres IR des sérums de souris obèses et normales, après immersion de la fibre, normalisés par rapport à la bande d'absorption du SCN<sup>-</sup>.

Les deux groupes de spectres se distinguent par leur niveau d'absorbance, il est plus élevé sur les spectres des sérums de souris obèses. Ceci mesure la différence d'alimentation qu'il existe entre ces deux types de souris.

Plus précisément, le massif de pics attribué aux vibrations de liaisons contenues dans les molécules de sucre ( $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ), est largement plus intense pour les quatre souris obèses. Cette augmentation indique un taux de sucre plus élevé dans les sérums de ces souris. Ce résultat est confirmé par le dosages biochimique du taux de glucose. Les souris normales ont un taux moyen de glucose [10] de  $10,71 \pm 1,14\text{ mmol/l}$ , alors qu'il est de  $33,1 \pm 4,1\text{ mmol/l}$  chez les souris obèses.

Par ailleurs, le massif de pics situé entre  $3000\text{ et }2800\text{ cm}^{-1}$  (vibration des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des lipides), est plus intense sur les spectres des souris obèses, excepté pour la souris obèse 02S78. Le taux de lipide serait donc plus important chez ces souris. Cependant, il ne s'agit pas d'une augmentation du taux de triglycérides comme cela a été montré dans le foie. En effet, le pic à  $1745\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=O}$  des esters des triglycérides) est absent, ainsi que celui à  $3010\text{ cm}^{-1}$  ( $>\text{C=CH}$  des triglycérides), et ceci est confirmé par les dosages biochimiques. Les souris normales ont un taux moyen de triglycérides de  $1,12 \pm 0,14\text{ mmol/l}$  et les souris obèses, de  $1,78 \pm 1,15\text{ mmol/l}$ . Par contre le dosage sérique du cholestérol est plus important chez les souris obèses. En effet, le taux moyen de cholestérol est de  $2,38 \pm 0,15\text{ mmol/l}$  chez les souris normales et de  $4,76 \pm 1,96\text{ mmol/l}$  chez les souris obèses. Toutefois, une souris obèse, la souris 02S78, se distingue avec un taux de cholestérol plus faible ( $1,98\text{ mmol/l}$ ), ce qui amène le taux moyen de cholestérol pour les trois autres souris obèses à  $5,59 \pm 0,77\text{ mmol/l}$ . Une des absorptions caractéristiques de cette molécule, se situe à  $1737\text{ cm}^{-1}$  [9]. Cette bande n'a pu être mise en évidence sur les spectres, de même que sur les dérivées secondes. D'autres bandes d'absorption ( $2929, 1466\text{ et }1059\text{ cm}^{-1}$ ) également caractéristiques du cholestérol, n'ont pu, elles aussi, être mises en évidence. Elles sont confondues avec les bandes d'absorption de toutes les autres molécules contenues dans le sérum. De plus, dans le sérum, le cholestérol est toujours lié à une apoprotéine de type HDL (High Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein), ce qui pourrait affecter les vibrations du cholestérol pur. Il n'a donc pas été possible d'identifier spectralement, le type de lipide en excès, dans le sérum de souris obèses.

De même que pour l'étude des foies obèses, l'allure du spectre de sérum de la souris obèse 02S78 est assez inattendue. En effet, son profil spectral ne correspond pas à celui des autres souris obèses, elle a pourtant été introduite au départ, comme étant une souris ob/ob. Dans la région des sucres ( $1100\text{ à }1000\text{ cm}^{-1}$ ), l'intensité des bandes est comparable à celle observée

sur les spectres de sérum de souris obèses. Par contre, dans la région des lipides (3000 à 2800  $\text{cm}^{-1}$ ), l'intensité de ces bandes est tout à fait comparable à celle observée sur les spectres de sérum de souris normales. Le profil particulier obtenu pour cette souris est confirmé par les dosages biochimiques, puisque son taux de glucose est comparable à celui des autres souris obèses, alors que son taux de cholestérol est lui, comparable à celui des souris normales.

#### 4.4.2 Discussion

Dans l'analyse spectroscopique IR des sérums de souris ob/ob, des mesures quantitatives n'ont pu être mises en œuvre. Le spectre du sérum est, en effet, complexe et nous ne sommes pas parvenus à isoler la ou les bandes d'absorption d'un élément en particulier et de relier l'intensité globale de ces bandes, à une concentration. Cependant, cette méthode permet déjà de détecter des variations qualitatives par rapport à un échantillon témoin.

L'excès alimentaire des souris ob/ob entraîne des anomalies métaboliques qui vont être responsables d'une hyperglycémie et d'une hyperlipidémie, anomalies qui ont pu être mises en évidence. Des enregistrements de spectres de sérum, plus ou moins enrichi en cholestérol, pourraient permettre de déterminer les régions spectrales sensibles à ce métabolite complexé aux apoprotéines. Le phénotype biochimique particulier de la souris obèse 02S78, a également été révélé par l'analyse spectrale IR.

Tous ces résultats sont corrélés aux dosages biochimiques. La présence de la souris 02S78 dans cette expérience, permet de valider le protocole mis au point, et montre le potentiel de cette technique pour des études quantitatives.

#### 4.5 Conséquences d'un jeûne

Nous avons cherché à évaluer la sensibilité de cette technique, quant à la détection de métabolites en différentes concentrations présents dans le sérum de souris, lors de variations métaboliques physiologiques.



Pour cela, le sérum des souris utilisées pour l'étude de l'influence d'un jeûne de différentes durées, sur le métabolisme du foie (voir chapitre III), a été analysé. La figure 6 rappelle les numéros des souris et les temps de sacrifice.

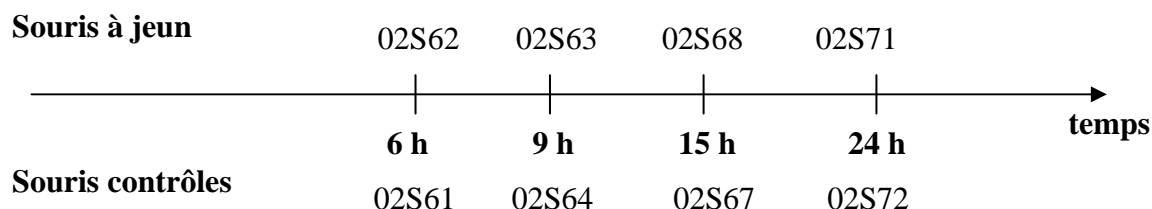


Fig. 6 : Temps de jeûne et numéros des souris à jeun et nourries correspondantes.

#### 4.5.1 Analyse des résultats

L'analyse des spectres normalisés par rapport au pic de  $\text{SCN}^-$  montre un certain nombre de différences (Fig. 7). Tout d'abord, il existe une différence d'absorbance qui sépare les deux groupes de spectres excepté pour la souris à jeun 02S62. Son profil spectral est comparable à celui des souris contrôles. Il s'agit de la souris qui a jeûné le moins longtemps (6 h).

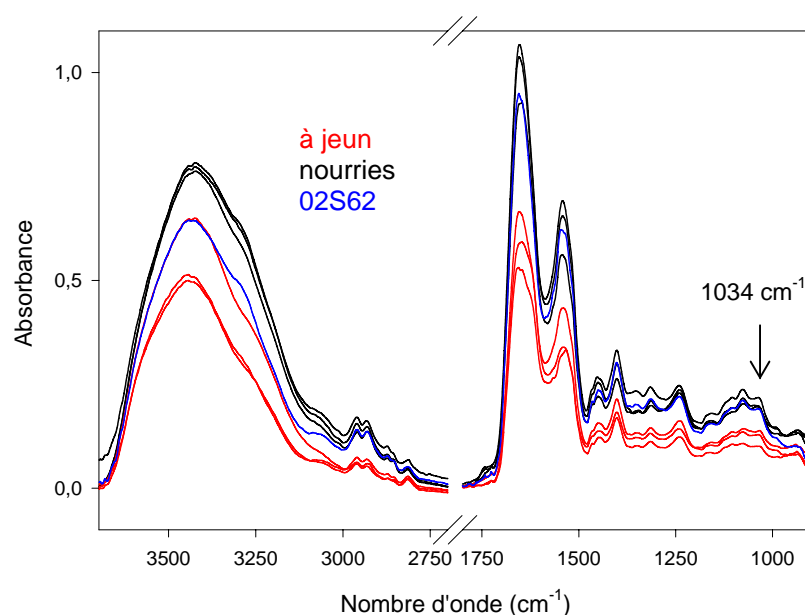


Fig. 7 : Spectres IR des sérums de souris à jeun et nourries, normalisés par rapport au pic du  $\text{SCN}^-$  et obtenus après immersion de la fibre dans le sérum.

La diminution du niveau d'absorbance sur les spectres de sérum de souris à jeun, est fonction du temps de jeûne, suggérant une réduction globale du taux circulant de métabolites dans le sérum.

Afin, d'apprécier le potentiel de cette technique pour des études quantitatives, l'intensité du pic à  $1034\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique du glucose [11], a été mesurée pour chaque temps de jeûne. Les résultats obtenus ont été comparés aux mesures biochimiques, réalisées sur ces mêmes échantillons. La figure 8 présente les résultats obtenus.

Le pic à  $1034\text{ cm}^{-1}$  se situe dans un massif, où plusieurs contributions se chevauchent. C'est pourquoi, la zone spectrale comprise entre  $1100$  et  $1000\text{ cm}^{-1}$  a été décomposée pour déterminer l'aire de la bande à  $1034\text{ cm}^{-1}$  caractéristique du glucose. La figure 8b représente l'aire de ce pic en fonction de la glycémie dosée dans les mêmes sérums. Une bonne corrélation est obtenue entre les deux paramètres malgré la petite taille de l'échantillon.

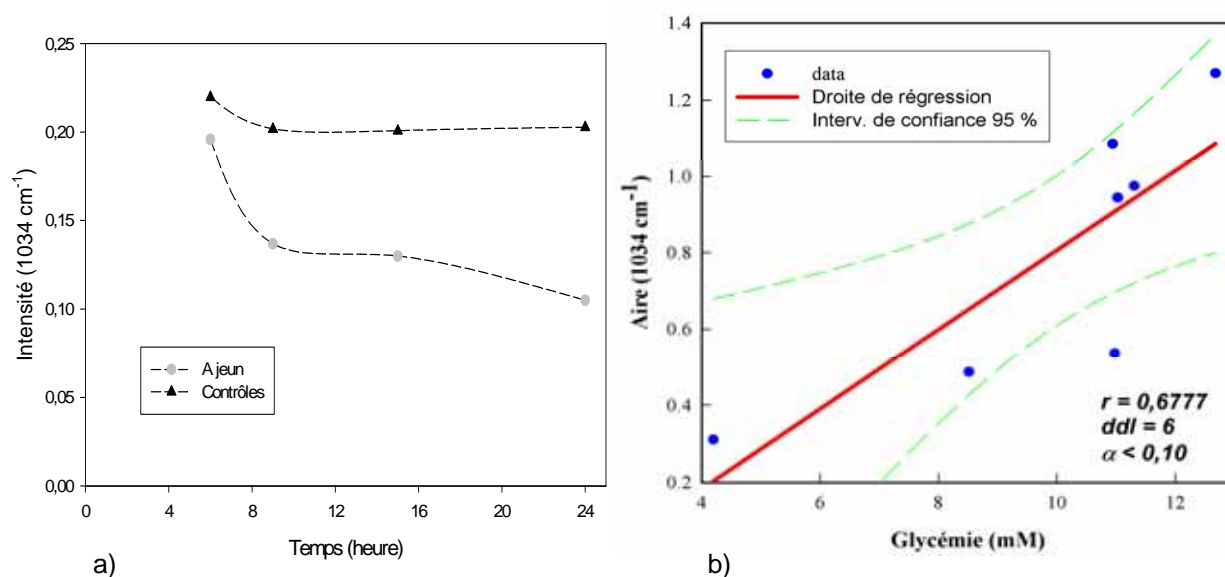


Fig. 8 : a) Evolution de l'intensité en unité de DO, du pic à  $1034\text{ cm}^{-1}$ , en fonction du temps de jeûne. b) Aire du pic à  $1034\text{ cm}^{-1}$  en fonction de la glycémie mesurée par dosages sanguins ( $r$ = coefficient de régression,  $ddl$ = degré de liberté,  $\alpha$ = risque).

#### 4.5.2 Discussion

L'analyse des conséquences d'un jeûne de différentes durées, permet de mettre en évidence la modulation de la glycémie qui accompagne le jeûne chez la souris. Il est malgré tout difficile avec cette technique, de relier l'intensité ou plus précisément l'aire d'un pic à une concentration. En effet, le sérum est un milieu biologique complexe, donnant en MIR une multitude de bandes d'absorption qui se chevauchent plus ou moins.

Compte tenu de la petite taille de l'échantillon, seule une appréciation semi-quantitative est possible. Un plus large échantillonnage serait bien sûr indispensable pour atteindre la précision requise. Toutefois, cette étape préliminaire laisse envisager que le biocapteur puisse apporter des mesures précises d'un métabolite sanguin.

#### 4.6 La surcharge en fer

La surcharge en fer a notamment pour conséquence au niveau sérique une augmentation du coefficient de saturation de la transferrine (molécule de transport du fer), une ferritinémie élevée [12], et l'apparition d'une forme anormale du fer, le fer non lié à la transferrine. Nous avons donc cherché à évaluer la capacité de ce biocapteur dans la détection d'anomalies sériques induites par une surcharge en fer.

Cette étude a été réalisée à partir des sérums de souris balb/c utilisées également pour l'étude des coupes de foies (voir chapitre III). Les souris surchargées en fer correspondent donc aux souris 02S51, 53, 55, et 57, et les souris normales, aux souris 02S50, 52, 54 et 56.

##### 4.6.1 Analyse des résultats

L'analyse des spectres montre clairement une différence au niveau de l'intensité générale des spectres. En effet, les spectres normalisés de sérum de souris surchargées en fer, ont un taux d'absorbance plus élevé sur pratiquement toute la gamme spectrale (Fig. 9).

L'intensité des deux bandes Amide I et II, caractéristiques des protéines, est plus importante sur les spectres de sérum de souris surchargées en fer. Cette augmentation pourrait être consécutive à une modification de la quantité de protéine dans les sérums. Il est connu qu'au cours d'une surcharge en fer, la concentration de ferritine, molécule de stockage du fer, augmente dans le sérum. Cependant, nous ne pouvons bien sûr pas attribuer les modifications spectrales à cette seule molécule, que nous n'avons pas pu doser.

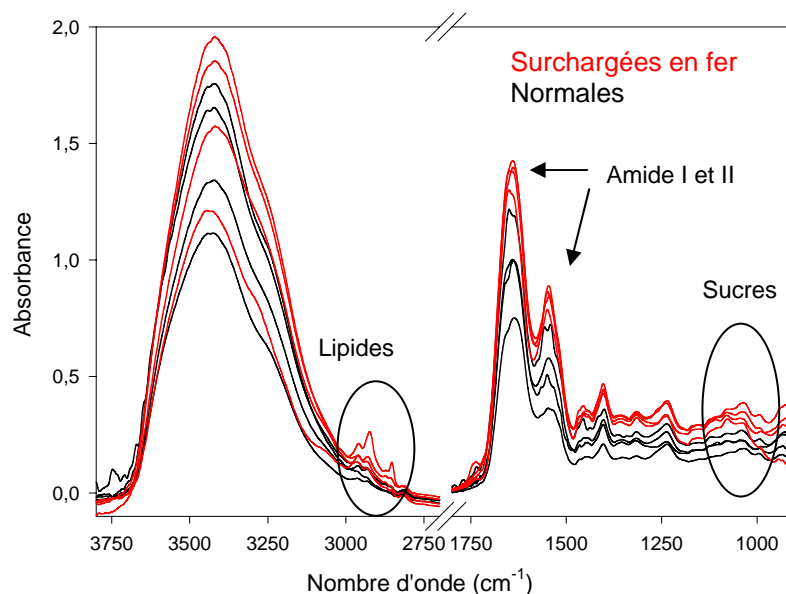


Fig. 9 : Spectres IR de sérum de souris surchargées en fer et normales, normalisés par rapport au pic de  $\text{SCN}^-$ , après immersion de la fibre.

Dans la région spectrale attribuée aux lipides ( $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ), une augmentation des bandes d'absorption indique un taux de lipides plus élevé dans les sérums de souris surchargées en fer. Les dosages biochimiques ont mis en évidence un taux de cholestérol plus important. Les souris surchargées en fer ont un taux de cholestérol moyen de  $3,33 \pm 0,15\text{ mmol/l}$ , alors que les souris normales ont un taux moyen de  $2,76 \pm 0,23\text{ mmol/l}$ . Comme il a déjà été mentionné au paragraphe 4.4.1, lors de l'étude des sérums de souris ob/ob, il n'a pas été possible de déterminer spectralement le type de lipide en excès dans ces sérums. Cependant, il est certain, qu'il ne s'agit pas d'un taux de lipides estérifiés de type triglycérides, puisque les pics à  $1745$  et  $3011\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=O}$  et  $\text{C=CH}$  des triglycérides), sont absents.

Concernant la région liée aux absorptions des molécules de sucre ( $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ ), il semble d'après les spectres, qu'il y ait un taux de sucres plus élevé dans les sérums de souris surchargées en fer. Cependant, les dosages biochimiques montrent qu'il ne s'agit pas là d'une augmentation du taux de glucose. Pour les souris normales, le taux moyen de glucose est de  $9,03 \pm 3,63\text{ mmol/l}$  et de  $10,18 \pm 1,64\text{ mmol/l}$  pour les souris surchargées en fer. Il existe donc de grandes variations du taux de glucose même au sein d'une population homogène, et aucune tendance ne ressort. Néanmoins, la région  $1100\text{ à }1000\text{ cm}^{-1}$ , est attribuée aux molécules de sucres en générale, et pas seulement au glucose. Notons tout de même, que la surcharge en fer, peut entraîner un diabète chez l'Homme.

#### 4.6.2 Discussion

L'analyse des spectres de sérums de souris surchargées en fer a permis de déceler une altération spectrale dans la région des sucres, des lipides et des protéines. L'augmentation du taux de lipide mis en évidence sur les spectres de sérum de souris surchargées en fer est en accord avec les dosages biochimiques, qui montrent un taux de cholestérol plus important chez ces souris. Le fort taux de protéines pourrait être en partie attribué à une synthèse plus importante de ferritine, molécule de stockage du fer. Cependant aucun décalage en nombre d'onde de la bande Amide I (caractéristique des structures secondaires des protéines) n'est constaté, bien que la ferritine soit constituée de nombreuses structures en hélice  $\alpha$  [13]. Néanmoins, les bandes Amide I et II représentent l'absorption de la totalité des protéines présente dans le sérum.

#### 4.7 Conclusion sur l'utilisation d'un étalon interne

Le choix du KSCN comme étalon interne semble judicieux pour des études sur les fluides biologiques. En effet, il n'interagit pas avec les biomolécules, et ne possède pas de raie d'absorption dans les zones d'intérêts pour nos études. Nous avons pu mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de cet étalon. Dans les applications traitées dans ce chapitre, les résultats sont cohérents et en accord avec les dosages biochimiques. Il n'a cependant pas été

possible de relier l'aire d'un pic à une concentration. En effet, la complexité du spectre du sérum, fait qu'il est difficile d'isoler une seule bande d'absorption, caractéristique d'une molécule en particulier. D'autres équipes [8] travaillent également sur la normalisation des spectres en utilisant du KSCN. Cependant, ils utilisent des techniques classiques de spectroscopie IR, et travaillent sur des films de sérum (temps de séchage > 45 min.). Pour ce qui nous concernent, l'objectif est de mettre au point une technique d'analyse fiable et rapide, impliquant de travailler à partir de matériel frais.

Les spectres ont été enregistrés avec une solution de KSCN diluée dans de l'eau distillée. Les expériences ont été refaites en diluant le KSCN dans du PBS (Phosphate Buffer Saline), un milieu largement utilisé en biologie, puisqu'il conserve l'osmolarité. Les résultats obtenus n'ont pas été aussi satisfaisants que ceux présentés dans ce chapitre. Cependant, la comparaison des spectres de sérum avec et sans PBS a montré que la présence de PBS aurait tendance à dénaturer les protéines. Notons, par ailleurs, que les résultats présentés ici, sont parfaitement en accord avec les dosages biochimiques et les données biologiques. De plus, la comparaison des spectres de sérum avec KSCN dilué dans de l'eau distillée et sans KSCN, ne montre aucune différences spectrales.

Pour finir, en travaillant à partir des spectres « fibre relevée », il est tout à fait envisageable de réduire la concentration de la solution de KSCN.

## 5. Analyse en Composantes Principales

L'Analyse en composantes principales (ACP) est une méthode statistique, permettant une analyse rapide d'échantillons, sans avoir besoin d'attribuer les bandes d'absorption (voir Chapitre II). Les analyses ont été réalisées à partir des spectres de sérum « pur » de souris et humain. Le logiciel utilisé pour réaliser l'ACP est OPUS Ident (Bruker).

## 5.1 Essais préliminaires : sérum de souris obèses

Les premiers essais d'ACP ont été réalisés à partir des sérums de souris ob/ob et contrôles. Sur les spectres de sérums purs (Fig. 10a), les différences n'apparaissent pas clairement. Une différence d'intensité entre les deux spectres moyens est perceptible, cependant, ils ont été collectés la fibre en contact avec la goutte de sérum, et ils ne sont pas normalisés. Il faut donc tenir compte du fait qu'il peut exister une différence d'absorbance, dû simplement à une différence de longueur de contact entre la fibre et l'échantillon de sérum.

La région choisie pour tester la méthode ACP, est celle attribuée aux molécules de sucres ( $1100$  à  $1000\text{ cm}^{-1}$ ). A priori, cette région devrait permettre la séparation des 2 groupes de spectres. En effet, comme nous l'avons vu lors de l'analyse des spectres au paragraphe 4.4.1, les sérums de souris obèses sont plus riches en glucose par rapport à celui des souris normales.

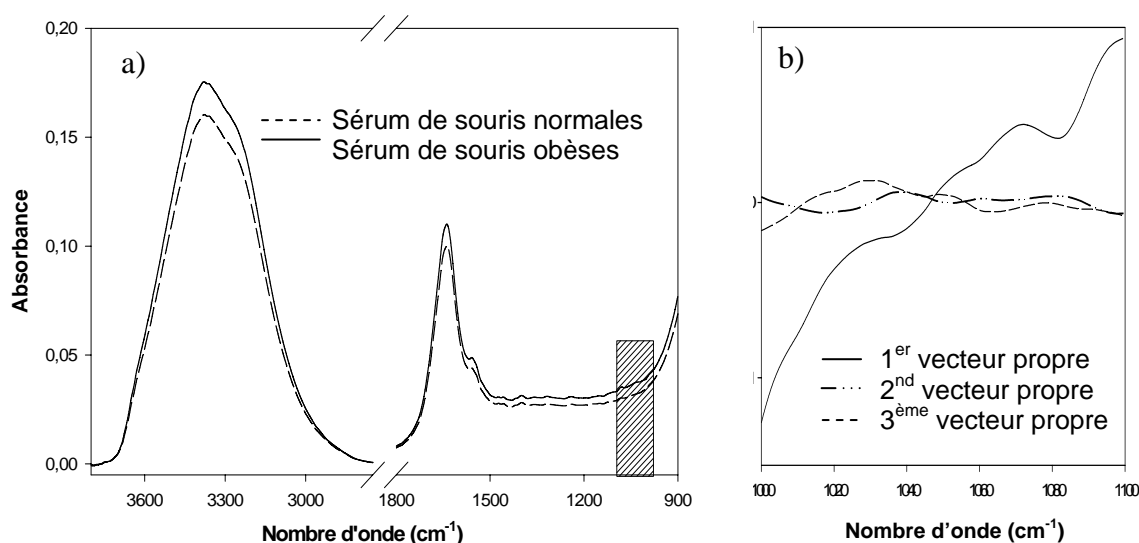


Fig. 10 : a) Spectres moyens des sérums de souris obèses et normales. b) Trois premiers vecteurs propres obtenus pour une ACP réalisée sur la région  $1100$  à  $1000\text{ cm}^{-1}$ .

La figure 10b présente les trois premiers vecteurs propres obtenus pour une ACP effectuée sur la région  $1100$  à  $1000\text{ cm}^{-1}$ . En représentant les coefficients de ces vecteurs, on montre que ce sont les deux premiers qui sont les plus discriminants (Fig. 11).

L'ACP permet bien de séparer les deux populations de spectres sur la région des sucres, comme nous nous y attendions. Le résultat montre que les deux familles de souris, se différencient au niveau du métabolisme des sucres mais ne permet pas de déterminer laquelle des deux, a le taux le plus important. Cependant, le but, ici, est de distinguer deux populations de souris, sans se préoccuper de ce qui permet de les séparer. Bien sûr, pour le spectroscopiste, ce résultat peut être interprétable. Les souris obèses sont diabétiques, et par conséquent, leur glycémie est supérieure à la normale, il est donc logique de pouvoir séparer les deux familles en réalisant une ACP sur cette région

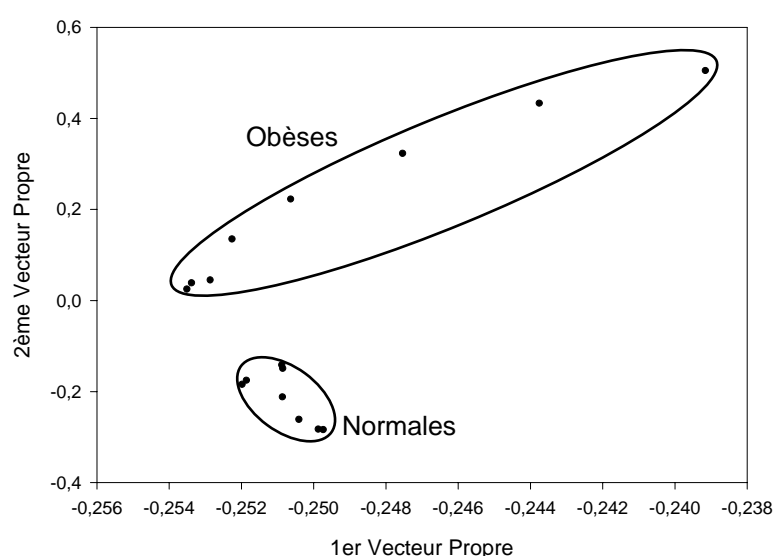


Fig. 11 : ACP des spectres de sérum pur de souris obèses et normales. Région : 1100 à 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Notons, que les points correspondant aux spectres de sérum de souris normales sont bien regroupés, montrant une forte homogénéité entre les spectres. Par contre, le nuage de points plus large pour les spectres de sérum de souris obèses, peut s'expliquer par différents niveaux de glycémie chez ces souris.

Nous avons donc réussi à isoler les deux groupes de souris, à partir de spectre de sérum pur (sans KSCN), et la fibre immergée dans l'échantillon. Cette méthode ne tient donc pas compte des variations aléatoires de longueur de contact. De plus, la discrimination entre ces



deux groupes de spectres, est possible alors que l'hydratation du milieu est importante et masque la plupart des bandes d'absorption des biomolécules.

## 5.2 Essais sur sérum humain

Nous avons ensuite testé cette méthode d'analyse spectrale, sur des cas cliniques en analysant des sérums humains. Les échantillons ont été prélevés sur des hommes de 18 à 70 ans au centre d'Examen de Santé de Rennes (Dr. Pouchard). Quatre groupes ont été analysés :

- 1- Un groupe de sujets sains, ne présentant pas de pathologie connue (n=30).
- 2- Un groupe de patients porteurs d'une cirrhose alcoolique (n=9). Ces patients étaient sevrés depuis 6 mois au moment du prélèvement sanguin, et présentaient une cirrhose jugée grave d'après la classification de Child (stade B et C, le plus grave).
- 3- Un groupe de patients hémochromatosiques (n=21), présentant à l'état homozygote, la mutation C282Y du gène HFE et surchargés en fer.
- 4- Un groupe de patients présentant une hépatosidérose dysmétabolique (n=8), qui associe une surcharge hépatique en fer habituellement modérée, et des troubles métaboliques variés : surpoids, hyperlipidémie, diabète ou intolérance au glucose, goutte, hypertension artérielle.

Les principales constatations biocliniques sont rassemblées dans le tableau I. Les spectres ont été enregistrés sur sérum pur, avec des dépôts de 10  $\mu$ l sur la partie capteur de la fibre

Pour déterminer les régions pertinentes sur laquelle réaliser l'ACP, les spectres moyens issus des spectres de la population saine et pathologique ont été comparés. Les résultats présentés ici, correspondent aux régions qui permettent la meilleure séparation des groupes.

	Témoïn Homme (n=30)	Cirrhose alcoolique (n=9)	Hémochromatose génétique (n=21)	Hépatosidrose dysmétabolique (n=8)
Age (année)	45,5 ± 9	54,3 ± 10	53,7 ± 10	45,2 ± 7,3
Body Mass Index	24,1 ± 2	25	25 ± 3	<b>27 ± 3 (p&lt;0,003)</b>
Fer sérique (μmol/l)	18,5 ± 4,5	18 ± 9	<b>34 ± 5 (p&lt;0,0001)</b>	18,2 ± 4,9
Coeff de Saturation transferrine (%)	35 ± 10	55 ± 39	<b>90 ± 11 (p&lt;0,0001)</b>	33 ± 14,3
Ferritine (μg/l)	190 ± 102	<b>494 ± 450 (p&lt;0,05)</b>	<b>1169 ± 1185 (p&lt;0,0001)</b>	<b>574 ± 248 (p&lt;0,0001)</b>
Glycémie (mmol/l)	5,3 ± 1,8	5 ± 0,48	5,3 ± 0,8	5,1 ± 0,7
Albumine (g/l)	41 ± 4	<b>27 ± 4,5 (p&lt;0,0002)</b>	41,8 ± 4	41,8 ± 3,4
Cholestérol (mmol/l)	5,2 ± 1,08	3,2 ± 0,37	5 ± 0,7	6,09 ± 1,4
Triglycérides (mmol/l)	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	<b>1,2 ± 0,6 (p&lt;0,0006)</b>	<b>0,9 ± 0,3 (p&lt;0,0001)</b>
α <sub>2</sub> globulines (g/l)	6,1 ± 0,6	<b>5,4 ± 1,7 (p&lt;0,0001)</b>	5,8 ± 0,7	6 ± 0,8
γ globuline (g/l)	9,2 ± 1,7	<b>18,7 ± 7,8 (p&lt;0,004)</b>	7,9 ± 2	9,4 ± 1,8
Prothrombine (%)	Non déterminé	59	94 ± 9	93 ± 10

Tableau I : Constatations biocliniques dans les quatre groupes de sujets étudiés. Les différences statistiques significatives (Test de Mann et Withney, significativité p<0,05) entre chaque groupe pathologique et le groupe témoin sont indiquées.

### 5.2.1 La cirrhose alcoolique

La cirrhose alcoolique est l'une des maladies du foie les plus fréquentes. Elle est la conséquence de l'atteinte du foie par un état pathogène. Elle associe une fibrose hépatique nodulaire, qui correspond à un dépôt excessif des constituants de la matrice extra-cellulaire, avec des phénomènes de régénération hépatique et une désorganisation vasculaire. Ceci conduit à une perte de l'architecture hépatique et à un dysfonctionnement sévère du foie [14].

D'après les données du tableau I, ce groupe est caractérisé par un abaissement du taux de prothrombine (trouble de coagulation) et d'albumine, lié à la baisse de la fonction hépatique et par une hyper  $\gamma$ -globulinémie en lien avec l'origine alcoolique de la maladie. L'hyperferritinémie peut être liée à un relargage de la protéine par les hépatocytes lésés et/ou à une réaction inflammatoire [15]

L'ACP a été réalisée sur la région 1308 à 1257  $\text{cm}^{-1}$ . La représentation 3D des coefficients des trois premiers vecteurs propres, permet de séparer nettement les deux populations (Fig. 12).

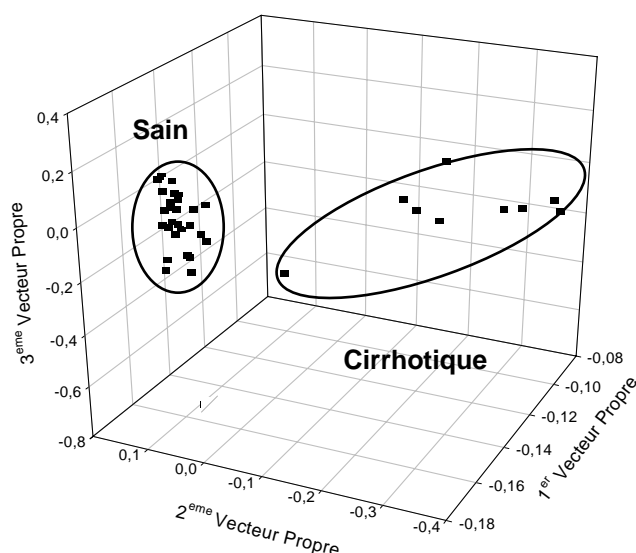


Fig 12 : ACP réalisée à partir des spectres de sérums humains, sains et pathologiques (cirrhose alcoolique). Région : 1308 à 1257  $\text{cm}^{-1}$ .

Le groupe témoin est bien homogène. La disparité du groupe pathologique peut être expliqué par des niveaux de gravité variable de la maladie. La région testée est attribuée à la bande amide III (déformation des liaisons CN et NH dans les protéines) [16]. Il semble donc que le profil protéique diffère entre ces deux groupes. Il est bien connu en effet, qu'en cas de cirrhose, il y a une diminution de la synthèse protéiques, dont l'albumine, due aux lésions des hépatocytes, ce qui influence le contenu en protéines du sérum. Les modifications spectrales misent en évidence par l'ACP correspondent bien à des anomalies biologiques et sont confirmés par le dosages de l'albumine (Tableau I). Notons, cependant, que la cirrhose n'est pas la seule pathologie entraînant une diminution du taux de protéine dans le sérum.

### 5.2.2 L'hémochromatose génétique

L'hémochromatose est une des maladies génétiques les plus fréquentes, elle touche 1 personne sur 300. Il s'agit d'un excès d'absorption intestinale du fer. Vers 40 ans, le fer accumulé dans les organes, commence à provoquer des lésions progressives, pouvant être fatales en l'absence de traitement [17 ;18].

D'après les données du tableau I, ce groupe est caractérisé par une élévation de l'ensemble des paramètres du bilan martial : fer sérique, saturation de la transferrine (protéine de transport du fer), ferritine (protéine de stockage du fer). Par ailleurs, des formes biochimiques anormales de fer peuvent être retrouvées (fer non lié à la transferrine) [19 ; 20] A noter, l'existence d'une élévation des triglycérides dans ce groupe.

L'ACP a été effectuée sur la région  $1560$  à  $1577\text{ cm}^{-1}$ . Ces bandes sont attribuées à l'absorption de la bande amide II des protéines (déformation NH et élongation CH). La figure 13 montre le résultat obtenu sur un graphique en 3D, où les trois dimensions représentent les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> vecteurs propres.

Il existe une zone de recouvrement entre les deux populations. Cependant, les spectres du groupe pathologique sont bien regroupés. Le recouvrement peut être expliqué par le fait que les anomalies du fer sérique ne sont pas suffisantes pour discriminer les groupes à ce stade de la maladie.

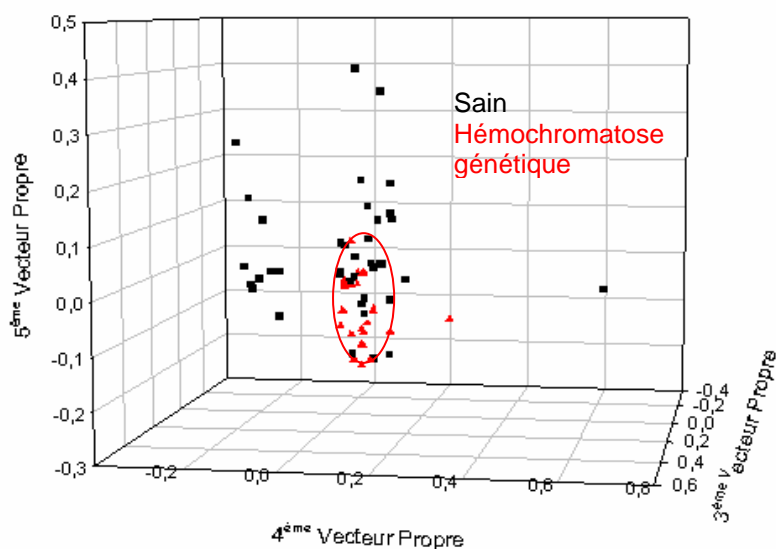


Fig. 13 : ACP sur les spectres de sérum humain sains et pathologiques (hémochromatose génétique). Région : 1560 à 1577  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.2.3 L'hépatosidérose dysmétabolique

D'après les données biocliniques (Tableau I), ce groupe est caractérisé par une hyperferritinémie avec un fer sérique et une saturation de la transferrine normale, caractéristique de la surcharge en fer particulière de ce syndrome. S'y associe une discrète obésité dont atteste l'augmentation de BMI (Body Mass Index) et une hypertriglycérinémie [21 ; 22].

L'ACP a été réalisée sur la région 2957 à 2924  $\text{cm}^{-1}$ , cette région correspond aux absorptions des chaînes lipidiques (élongation  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$ ). La figure 14 montre la carte vectorielle construite à partir des deux premiers vecteurs propres.

Les deux populations sont bien séparées en utilisant les deux premiers vecteurs propres. Cette pathologie entraîne souvent une hyperlipidémie, ce qui explique la séparation des deux groupes par rapport à la région des lipides.

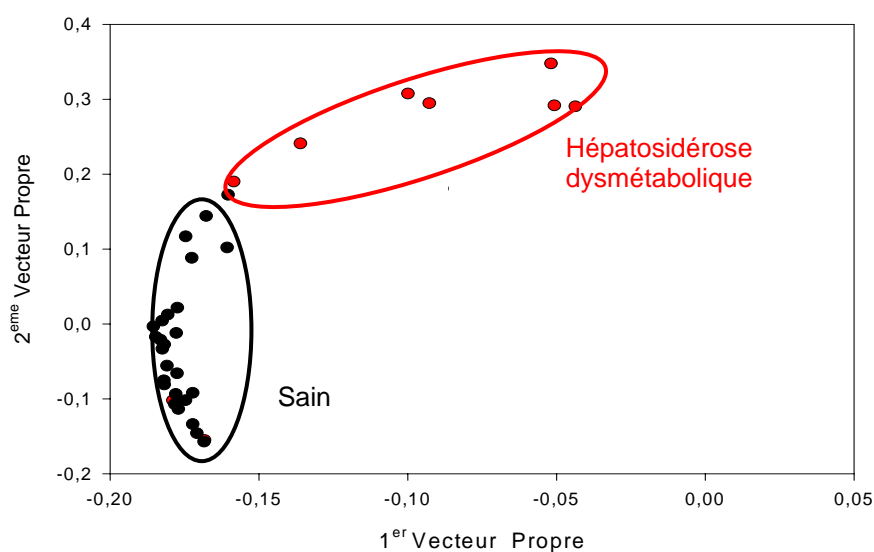


Fig 14. : ACP sur les spectres de sérums humains sains et pathologiques (hépatosidérose dysmétabolique). Région : 2957 à 2924  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.2.4 Reconnaissance non supervisée d'une pathologie particulière

Les régions permettant de séparer les groupes pathologiques du groupe sain ont été utilisées pour effectuer une ACP sur l'ensemble des spectres (groupes témoin, cirrhose, hémochromatose et hépatosidérose dysmétabolique). Le résultat est montré sur la figure 15 par une représentation en 3D, des trois premiers vecteurs propres.

Le groupe « cirrhose alcoolique » est de nouveau bien isolé des autres spectres. Le groupe « hépatosidérose dysmétabolique » possède une zone de recouvrement avec les témoins hommes qui n'existait pas sur la représentation 2D présentée au paragraphe 5.2.3. Par contre, avec cette représentation, il n'est pas possible d'isoler le groupe « hémochromatose génétique ».

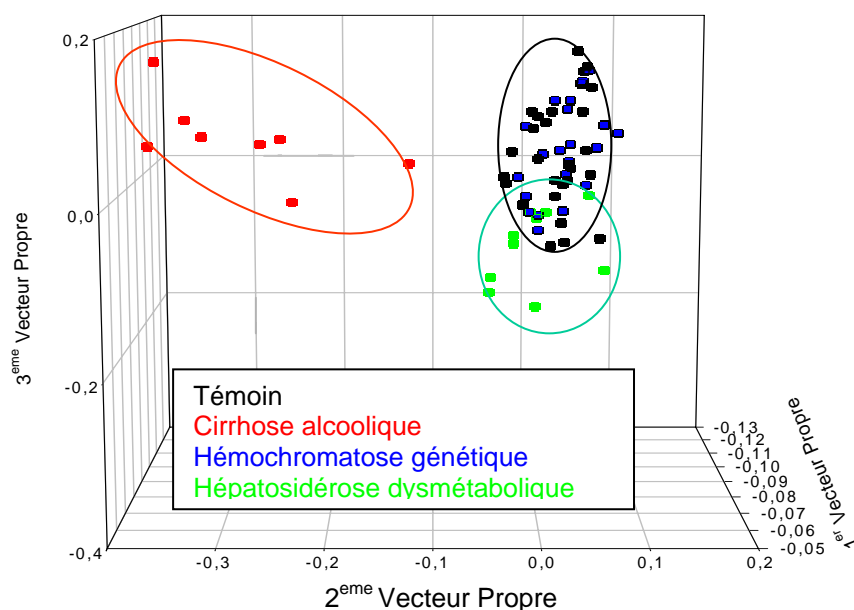


Fig. 15 : ACP sur les spectres de sérums humains sains et pathologiques (cirrhose alcoolique, hémochromatose génétique et hépatosidérose dysmétabolique). Régions : 2957 à 2924  $\text{cm}^{-1}$ , 1560 à 1577  $\text{cm}^{-1}$  et 1308 à 1257  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3 Conclusion sur l'ACP

L'ACP a permis de mettre en évidence des populations malades par rapport à une population saine. L'analyse est rapide et ne nécessite pas l'attribution des bandes d'absorption. Même si l'interprétation des vecteurs propres reste possible, elle n'est pas nécessaire.

Les premiers résultats d'ACP, présentés dans ce chapitre, sont encourageants et doivent nous inciter à continuer dans cette voie. Il est en effet nécessaire, dans un premier temps, d'augmenter la taille des groupes d'étude. Dans un second temps, il est sans doute possible d'optimiser les conditions de l'ACP en déterminant notamment de nouvelles régions d'intérêt. Ceci pourrait permettre de séparer des pathologies quand l'ACP est réalisée sur plusieurs groupes en même temps. Cependant, cette méthode d'analyse permet déjà d'orienter vers une pathologie ou une autre.

## 6. Conclusion

Nous avons testé deux méthodes d'analyse d'un fluide biologique : une méthode quantitative en introduisant un étalon interne et l'Analyse en Composantes Principales (ACP) sur des échantillons de sérum.

Nous avons montré l'intérêt de la normalisation des spectres par rapport au pic d'absorption d'un étalon interne, et le KSCN semble être un bon candidat. L'analyse des spectres de sérum « fibre en contact » est difficile. En effet, le sérum est un milieu très hydraté et la contribution de l'eau sur les spectres masque les bandes d'absorption d'intérêt. Par contre, l'analyse des spectres de sérum « fibre relevée » s'est révélée plus intéressante, du fait de la plus faible contribution de l'eau sur les spectres. Cependant, les analyses quantitatives restent difficiles. Le sérum est un milieu complexe, et il n'est pas possible, avec cette technique, d'isoler une seule bande d'absorption caractéristique d'une seule molécule en particulier. Cependant, dans la configuration actuelle de la fibre, il est possible de déterminer une ou des altérations du métabolisme, lorsque les spectres sont normalisés par rapport au pic du KSCN. Cette méthode permet déjà d'orienter le diagnostic.

L'Analyse en Composantes Principales pourrait être une piste, non pas pour des études quantitatives mais qualitatives rapides. Il semble, en effet, possible avec cette méthode de mettre en évidence des signatures pathologiques, permettant de séparer des groupes sains et pathologiques et ainsi, d'orienter le diagnostic. Cette méthode peut être étendue à d'autres pathologies ayant des répercussions sur le sérum. Enfin, l'enregistrement de banques de données de différentes pathologies, pourrait permettre des analyses « non-supervisées » par des non-spécialistes puisque aucune analyse spectrale n'est nécessaire avant une ACP.

Pour finir, quelle que soit l'analyse spectrale utilisée, quelques microlitres suffisent à l'enregistrement d'un spectre. La spectroscopie par fibre optique permet donc d'obtenir une information globale du fluide biologique analysé à partir d'une très petite quantité de matériel. De ce fait, les études sont simples et rapides à mettre en œuvre.



## RÉFÉRENCES

- [1] *Physiologie Humaine*, 3<sup>ème</sup> Ed., A.J. Vander et al., MacGraw-Hill/Chendrière, Montréal, (1995).
- [2] Q. Friedewald, R. Levy, D. Fredrikson, *Clin Chem*, (1972), 18, 499-502.
- [3] J.J. Max, M. Trudel, C. Chapados, *Appl. Spectros.*, (1998), 52 (2), 234-239.
- [4] J.J. Max, C. Chapados, *Appl. Spectros.*, (1998), 52 (7) : 963-969.
- [5] K.J. Rotschild, N.A. Clark, *Biophys. J.*, (1979), 47, 473-488.
- [6] S.Y. Venyaminov, N.N. Kalnin, *Biopolymers*, (1990b), 30, 1243-1257.
- [7] M. Cortijo, M. Alonso, J.C. Gomez-Fernandez, D. Chapman, *J. Mol. Biol.*, (1982), 157, 597-618.
- [8] R.A. Shaw and H.H. Mantsch, « *Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis* » in Encyclopedia of Analytical Chemistry, Robert A. Meyers, John and Willey Ltd., Chichester, (2000).
- [9] U. Binding, M. Meinke, I. Gersonde, O. Spector, I. Vasserman, A. Katzir, G. Muller, *Sensor and actuator B*, (2001), 74, 37-46.
- [10] R.W. Gelling, X.Q. Du, DS Dischann, J. Romer, H. Huang, L. Cui, S. Obici, B. Tang, J.J. Holst, C. Fledelius, P.B. Johansen, L. Rossetti, L.A. Jelicks, P. Serrup, E. Nishimura, M.J. Charron, *PNAS*, (2003), February 4, Vol. 100, No.3, 1438-1443.
- [11] T.Uemura, K.Nishida, M.Sakakida, K.Ichinose, S.Simoda, M.Shichiri, *Frontiers Med. Biol. Engng*, (1999), Vol. 9, No. 2, 137-153.
- [12] Haziza-Pigeon Christelle, « *Mise en évidence par hybridation suppressive soustractive de la surexpression de deux gènes dans le foie de souris surchargée en fer* », Thèse, Université de Rennes 1, décembre 1999.

- [13] N. D. Chesteen and P.M. Harison, *Journal of structural Biology*, (1999), Vol. 126, 182-194.
- [14] E. Martin et G. Feldmann, *Histopathologie du foie et des voies biliaires*, Ed. Masson, Paris, (1983), 9.
- [15] F. Lainé, M. Ropert, C. Le Lan, O. Loréal, E. Bellissant, C. Jard , M. Pouchard, A. Le Treut, P. Brissot, *Journal of Hepatology*, (2002), 36, 60-65.
- [16] A.I. Ivanov, E.A. Korlenko, S.P. Firsov, R. G. Zhabankov, K. Marchewka, H. Ratajczak, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (2002), 408, 69-77.
- [17] R. Saddi, J. Feingold, *Clin. Genet.*, (1974), 5, 234-41.
- [18] M.Simon, M. Bourel, B. Genet, R. Fauchet, *N. Engl. F. Med*, (1977), 297, 1017-21.
- [19] P. Brissot, Y. Deugnier, *Normal iron metabolism*, In Oxford Textbook of clinical hepatology, N. MacIntyre, J. Benchamou, J. Bircher, M. Rizetto and J. Rode, eds. (Oxford : Oxford University Press), (1999), 1379-1391.
- [20] P. Brissot, Y. Deugnier, *Heamochromatosis*, In Oxford Textbook of clinical hepatology, N. MacIntyre, J. Benchamou, J. Bircher, M. Rizetto and J. Rode, eds. (Oxford : Oxford University Press), (1999), 1379-1391.
- [21] R. Moirand, A.M. Mortaji, O. Loréal, F. Paillard, P. Brissot, Y. Deugnier, *Lancet*, (1999) 349, 95-7.
- [22] M.H. Mendler, B. Trulin, B. Moirand, A.M. Jouanolle, T. Sapey, D. Guyader, J.Y Legall, P. Brissot, V. David, Y. Deugnier, *Gastroenterology*, (1999), Nov., 117 (5), 1155-63.

## **CHAPITRE V**

**APPLI CATION EN MI CROBI OLOGI E**

**SUIVI D'UN BIOFILM BACTÉRIEN**

## 1. Introduction

L'essentiel de nos connaissances fondamentales en microbiologie a pour origine des études réalisées en milieu liquide, dans des conditions où les bactéries ont un mode de vie planctonique. Pourtant, dans la plupart des biotopes, les populations bactériennes se développent associées aux surfaces et forment des populations fixées, hétérogènes et multi-spécifiques, appelées **biofilms**.

Les biofilms sont présents dans tous les environnements naturels et sont également très répandus dans les environnements industriels ou médicaux, où ils posent de sérieux problèmes d'énergie et d'hygiène, notamment pour le matériel biomédical (cathéters, prothèses, surfaces de locaux,...). En effet, le développement de biofilms sur l'instrumentation médicale constitue un problème majeur, car ils sont sources de contamination, contribuant au développement d'infections nosocomiales [1 ;2]. De plus, l'élimination des biofilms est rendue particulièrement difficile en raison de la résistance des bactéries aux détergents classiques et aux antibiotiques [3]. Le contrôle du biofilm est donc un enjeu de santé publique.

Le Laboratoire de Biologie et Chimie Moléculaires (LBCM) de l'Université de Bretagne-Sud développe une recherche concernant la dynamique de croissance des biofilms à partir du modèle de migration concertée (essaimage) de *Proteus mirabilis*, agent pathogène opportuniste des voies urinaires. Cette bactérie a développé un comportement multi-cellulaire complexe, corrélé dans l'espace et le temps, qui lui permet de coloniser de nouvelles surfaces. Le modèle étudié *in vitro*, sur boîte de pétri, semble pouvoir rendre compte de la capacité de cette bactérie à remonter les voies urinaires vers le rein où elle y induit la formation de calculs. Une première étude menée en microscopie ATR a permis de définir des marqueurs spectraux infrarouges permettant de distinguer les bactéries planctoniques (végétatives) des bactéries différenciées (migrantes). Les technologies utilisées, bien que non-invasives, sont coûteuses et lourdes à mettre en œuvre puisqu'elles sont basées sur la microscopie infrarouge. La définition et l'optimisation de capteurs dédiés permettrait un suivi et une détection de biofilms bactériens dans différents contextes du domaine médical.

C'est pourquoi, en collaboration avec le LBCM, nous avons étudié le développement de biofilms bactériens par spectroscopie à fibre optique. Nous avons tout d'abord démontré la

possibilité de détecter une contamination en temps réel et *in situ*. Puis, nous avons cherché à déterminer la distribution spatiale de deux phénotypes présents au sein du biofilm, par Analyse en Composantes Principales (ACP).

## 2. Les biofilms bactériens

Dans tous les environnements (roches, plaques dentaires, plastiques, lentilles de contact, cathéters, canalisations, tractus digestif etc...), les populations bactériennes se développent principalement en s'associant aux surfaces. Elles forment ainsi des populations sessiles appelées **biofilms** [4].

Un biofilm se définit comme étant une communauté microbienne immobilisée sur une surface, enfouie dans une matrice de polysaccharides fortement hydratée [5]. La formation de biofilm constitue l'une des stratégies de survie développées par les micro-organismes. En effet, cet état leur confère de nombreux avantages. Par exemple, les cellules microbiennes enfouies dans l'épaisseur du biofilm, sont protégées des agressions éventuelles du milieu extérieur (ultraviolet, pH, pollution chimique, système immunitaire de l'hôte, etc...) et peuvent donc survivre dans des conditions d'environnement défavorables (milieux pauvres en nutriments, stress,...). Dans leur environnement naturel, les biofilms jouent donc un rôle de réservoir de micro-organismes et garantissent l'équilibre écologique.

La formation d'un biofilm commence nécessairement par l'adhésion d'un petit nombre de bactéries sur la surface [6]. L'adhésion met en jeu des interactions physico-chimiques entre la surface du matériau, la paroi bactérienne et le milieu environnant. On considère généralement que les bactéries adhèrent au matériau selon un mécanisme se déroulant en deux étapes :

1- Au cours de la première, les bactéries en suspension sont transportées suffisamment près de la surface pour pouvoir y être adsorbées. Cette étape est réversible et les cellules peuvent être facilement désorbées de leur support et être relarguées dans le milieu environnant.

2- La seconde étape ne survient qu'après un certain temps de latence. Contrairement à l'étape précédente, les bactéries ne peuvent plus être aisément détachées. Les cellules adhèrent alors de façon stable à la surface.

La formation du biofilm implique la biosynthèse massive d'exoproduits, les exopolysaccharides (EPS) qui constituent le slime et contribuent à la protection des bactéries contre les agressions extérieures (agents anti-microbiens, des leucocytes, ou autres....). Cette couche visqueuse enrobe le biofilm. Son rôle est également de faciliter la migration des bactéries aux surfaces [7]. Cette matrice permet de renforcer la structure du biofilm tout en maintenant une certaine plasticité. Au sein de ces biofilms, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments et d'autre part, d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'EPS et être utilisé par les bactéries [5].

L'adhésion des micro-organismes sur des surfaces est un phénomène quasi universel, les formes non-fixées étant minoritaires dans le milieu naturel, les formes libres ne représenteraient ainsi que 0,5 ‰ de la population bactérienne totale.

La formation du biofilm est également régulée par un système largement répandu dans le monde procaryote, le « *quorum sensing* ». Il s'agit d'un processus de communication inter-cellulaire, basé sur le seuil critique de production d'un auto-inducteur, qui induit la formation du biofilm [8]. Chez les bactéries à Gram négatif, il s'agit le plus souvent de la phéromone N-acyl-L-Homoserine lactones (AHL), qui influe sur le phénotype en réponse à la densité cellulaire du biofilm.

Les biofilms peuvent avoir des conséquences néfastes, car on les rencontre partout dès lors que l'on trouve des surfaces humides. Par exemple, les cathéters urinaires sont très souvent colonisés par les biofilms bactériens, ce risque étant proportionnel à la durée d'implantation du cathéter. Ils créent ainsi des infections urinaires. Ces micro-organismes indésirables, peuvent donc avoir des conséquences importantes à la fois sur le plan sanitaire et économique. L'étude du développement des biofilms est donc d'un enjeu capital dans les domaines biomédical et agro-alimentaire, entre autres.

### 3. *Proteus mirabilis*

*Proteus mirabilis* est un micro-organisme pathogène, opportuniste des voies urinaires, qui sous la forme de biofilm, provoque la plupart du temps, des calculs rénaux. Elle fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles Gram négatif, anaérobie facultative, mesurant de 0,4 à 0,8  $\mu\text{m}$  de largeur et de 2 à 80  $\mu\text{m}$  de longueur.

Cette bactérie a développé un comportement multi-cellulaire complexe, corrélé dans le temps et l'espace lui permettant ainsi, de coloniser de nouveaux territoires. En effet, dans le cas de *Proteus mirabilis*, lorsque des bactéries, initialement nageuses, se retrouvent sur un milieu solide, elles développent une autre forme de déplacement : l'**essaimage** (swarming) [9-12].

Ensemencées au centre d'une boîte de pétri gélosé, les bactéries se multiplient pour donner une colonie. Lorsque le milieu s'épuise, de nouvelles formes apparaissent, plus longues et mobiles, aptes à se déplacer à la surface du milieu. La coordination de mouvements de ces cellules, dites migrantes, permet de coloniser un endroit plus riche en nutriments. Elles donnent alors naissance à des formes courtes faiblement mobiles, dites cellules végétatives. L'appauvrissement du milieu provoquera de nouveau l'apparition de formes longues. Ces cycles de croissance synchrones et périodiques, se traduisent par la formation de halos concentriques (terrasses) (Fig. 1). En laboratoire, l'essaimage de *Proteus mirabilis* peut être obtenu sur de l'agar.

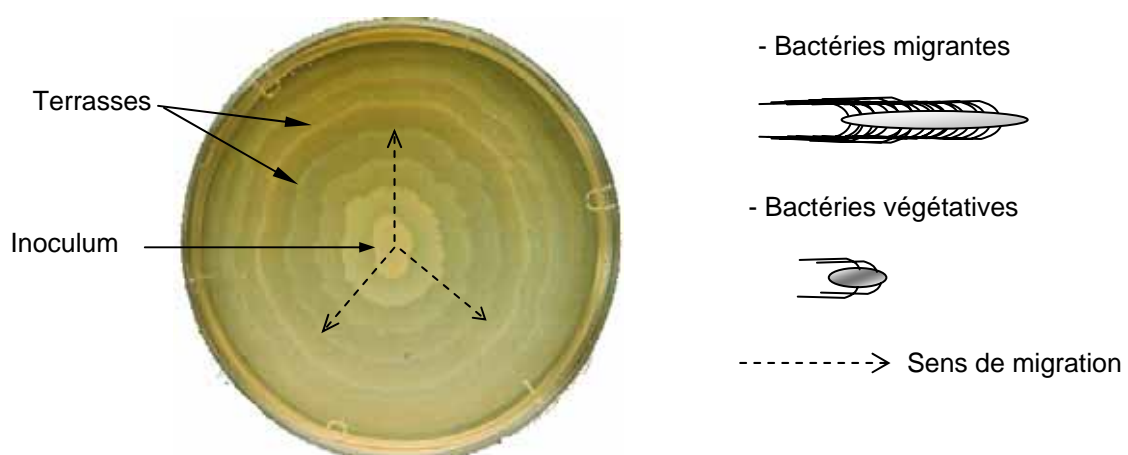


Fig. 1 : Culture de *Proteus mirabilis* rendant compte de son cycle de différenciation.

L'essaimage nécessite une véritable différenciation cellulaire des bactéries. Les cellules s'allongent, la longueur peut atteindre jusqu'à 80  $\mu\text{m}$ , et deviennent polyploïdes. C'est un phénomène collectif et coordonné, car une cellule isolée est incapable d'essaimer seule à la surface de la gélose [13].

L'induction de l'essaimage est déclenché par des facteurs inhibant la rotation des flagelles et par la présence de signaux extra-cellulaires. Il semble que les flagelles se comportent comme des structures aptes à analyser les conditions du milieu ambiant et à transmettre les signaux à la cellule.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des glycolipides complexes. Ce sont des constituants de la membrane externe des bactéries Gram négatif tel que *Proteus mirabilis* [14 ;15]. Ils participent à des fonctions physiologiques essentielles à la survie et au développement de la bactérie. Il semblent jouer également un rôle particulier dans la formation du biofilm, notamment pour l'adhésion sur différents types de surfaces [16].

Chez *P. mirabilis*, la migration est associée à la virulence puisque les agents pathogènes ne sont exprimés que chez le phénotype migrant [17-18]. Chez l'Homme, les infections les plus fréquentes concernent l'appareil urinaire. *Proteus mirabilis* est la bactérie le plus souvent isolée des urines, et est à l'origine d'infections graves (obstruction des voies urinaires, formations de calculs vésicaux ou rénaux...), et parfois mortelles. Ces infections sont fréquentes en milieu hospitalier et chez les patients âgés. De ce fait, la compréhension du développement de *Proteus mirabilis* est un enjeu important pour combattre le développement de tels biofilms en milieu hospitalier.

#### 4. Détection d'une contamination de surface

Dans cette étude, nous avons voulu testé le potentiel de cette technique dans la détection d'une contamination de surface. L'objectif est de détecter spectralement le développement d'un biofilm bactérien au niveau d'une surface à l'aide de la fibre.



#### 4.1 Mode opératoire

La souche sauvage de *Proteus mirabilis* WT19, correspond à l'isolat clinique U6450 [19]. WT19 a été mis en pré-culture dans un milieu LB à 37°C, pendant toute une nuit. Puis, 5 µl de la culture liquide ont servi àensemencer une boîte de pétri, sur milieu LB agar (1,5%). Les boîtes de culture sont ensuite placées à l'étuve (37°C) jusqu'à ce que le biofilm ait atteint un rayon de 20 mm. A ce stade, la croissance du biofilm est poursuivie grâce à un dispositif chauffant (platine chauffante de WPI) et le suivi du développement du biofilm par le biocapteur est initié jusqu'au doublement approximatif du rayon, ce qui nécessite quelques heures. Le montage expérimental consiste à placer la partie senseur de la fibre, en « U », en contact avec la gélose. Puis, des spectres MIR (résolution spectrale de 4 cm<sup>-1</sup>, 100 scans) sont enregistrés toutes les 15 min., avant, pendant et après le passage des bactéries au niveau de la fibre (Fig. 2).

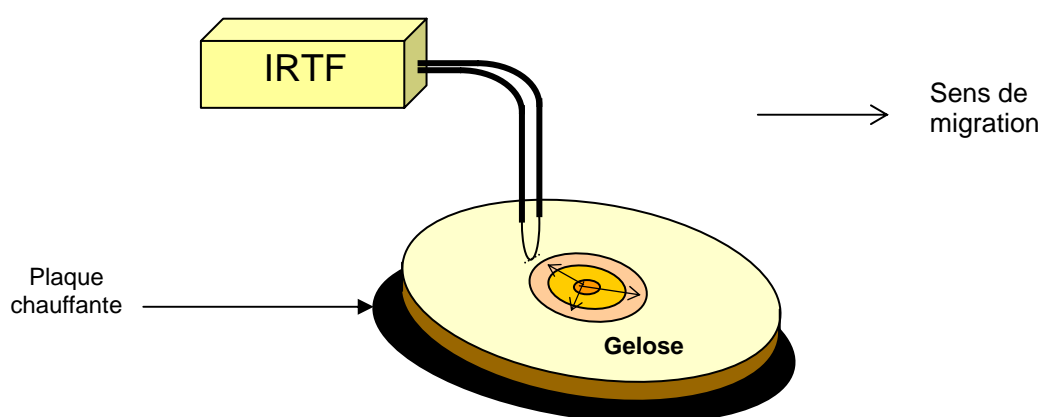


Fig. 2 : Schéma du montage expérimental utilisé pour le suivi en temps réel du développement d'un biofilm de *Proteus mirabilis*.

#### 4.2 Analyse des résultats

La figure 3 montre les spectres enregistrés au cours du développement du biofilm. En début d'expérience, la fibre optique est placée au-delà du front de migration, c'est pourquoi, les premiers spectres correspondent à celui de la gélose, dominés par l'absorption de l'eau.

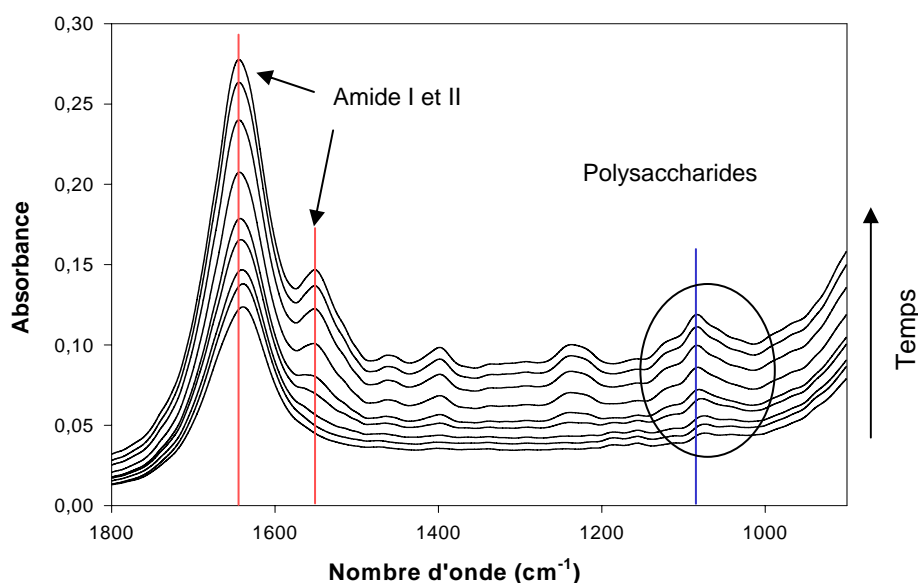


Fig. 3 : Spectres MIR enregistrés au cours du développement d'un biofilm de *Proteus mirabilis*.

La région  $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique des bandes d'absorption des protéines. La bande attribuée à la vibration de déformation de l'eau ( $\delta\text{OH}$ ) à  $1636\text{ cm}^{-1}$ , est progressivement remplacée par l'augmentation d'intensité de la bande Amide I à  $1650\text{ cm}^{-1}$ . La bande Amide II ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ) apparaît conjointement en fonction du temps. L'apparition de ces deux bandes (Amide I et II), témoigne de l'arrivée des bactéries (front) au contact de la fibre optique, l'augmentation globale des intensités indique une augmentation de la biomasse au cours du temps.

La région spectrale entre  $1100\text{ et }1000\text{ cm}^{-1}$  subit des modifications au cours du temps de développement. Les dérivées secondes des spectres (Fig. 4), montrent clairement un décalage en nombre d'onde de  $1076\text{ à }1086\text{ cm}^{-1}$ . Cette région est attribuée aux vibrations des cycles polysaccharidiques. *Proteus mirabilis*, bactérie Gram négatif, possède une double membrane dont la membrane externe est constituée de lipopolysaccharides (LPS) [20 ;21]. De plus, pendant la formation du biofilm, les bactéries migrantes sécrètent des exoproduits, le slime, composé majoritairement d'exopolysaccharides (EPS). Ces molécules présentent une grande similitude chimique et structurale, avec les LPS.

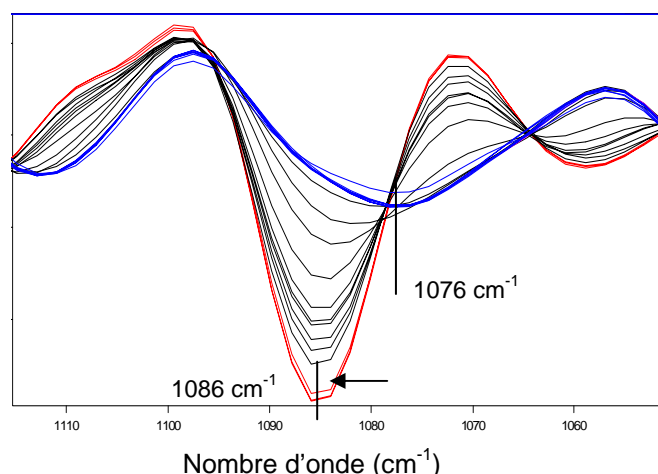


Fig. 4 : Dérivées secondes des spectres d'un biofilm à *Proteus mirabilis*.

Ainsi, le décalage en nombre d'onde en fonction du temps indique que les bactéries migrantes sont caractérisées par un pic à 1076 cm<sup>-1</sup>. C'est en effet, le phénotype qui est présent au sein du front de migration et donc est le premier à être enregistré par la fibre optique. Ce pic est progressivement remplacé par celui à 1086 cm<sup>-1</sup>, lorsque les bactéries se différencient pour donner une forme végétative, en arrière du front de migration.

### 4.3 Discussion

Cette technique permet de détecter *in situ* et en temps réel, l'arrivée des bactéries au contact de la fibre optique. De plus, ces analyses montrent que l'étude spectrale permet de d'identifier des marqueurs caractéristiques de phénotypes distincts d'une même souche bactérienne. Dans le cas de *Proteus mirabilis*, la modification des polysaccharides reflète le changement d'un phénotype de cellules migrantes (phénotype pathogène) en un phénotype différencié (cellule végétatives). Cette étude démontre également l'existence de signatures IR différentes permettant de résoudre à la fois en temps et dans l'espace, les changements métaboliques intervenant dans un système biologique complexe.

## 5. Cartographie IR des phénotypes de *P. mirabilis* au sein d'un biofilm

Nous avons cherché à déterminer la distribution spatiale des deux phénotypes présents au sein du biofilm de *Proteus mirabilis*. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé deux banques de données de spectres références, pour :

- les bactéries situées à l'inoculum
- les bactéries situées à la périphérie de la culture

Les séries de spectres analysées au paragraphe 4.1 ont été comparées à ces deux banques de données, par Analyse en Composantes Principales (ACP). Le logiciel utilisé pour l'ACP est TQ Analyst (NICOLET).

### 5.1 Enregistrement des banques de spectres références

Pour constituer les banques de références, plusieurs spectres de bactéries, situées à l'inoculum et à la périphérie, ont été enregistrés.

Pour cela, les cultures de *Proteus mirabilis* ont été réalisées de la même façon qu'au paragraphe 4.1. Elles ont été placées dans un incubateur (37 °C), jusqu'à ce que la colonie atteigne un diamètre d'environ 5 cm. Puis, des échantillons de bactéries, situées à la périphérie de la culture, ont été prélevés à l'aide d'une spatule, et mis directement en contact avec la partie sensible de la fibre. Un total de 17 spectres ont été enregistrés. De la même façon, 20 spectres de bactéries de l'inoculum ont été enregistrés.

Entre chaque spectre, la fibre est nettoyée plusieurs fois à l'eau distillée puis séchée à l'air et un spectre référence à l'air est enregistré. Les prélèvements ont été réalisés à partir de 6 boîtes de culture de *Proteus mirabilis*.

### 5.2 Sélection des régions spectrales pour l'ACP

L'analyse non-supervisée des spectres nécessite d'identifier les régions spectrales les plus discriminantes pour optimiser l'ACP. La figure 5a montre les spectres moyens et écarts-

types calculés pour chacune des deux banques de spectres de référence. Ces spectres ont donc été utilisés pour calibrer la méthode.

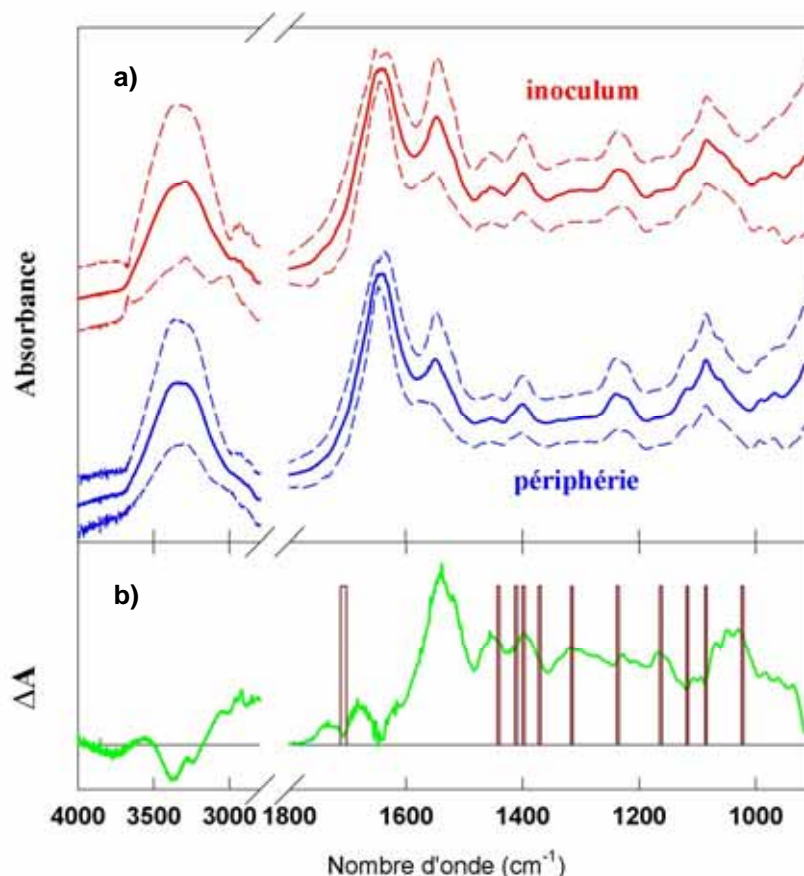


Fig. 5 : a) Spectres moyens et écarts-types des banques de spectres références *inoculum* et *périphérie*. B) Spectre différence ( $\Delta A = \text{inoc} - \text{periph.}$ ) et régions sélectionnées pour l'ACP.

Puis, le spectre différentiel (différence entre spectres moyens *inoculum* et *périphérie*) a été calculé. Ce spectre met en évidence les domaines spectraux présentant de grandes différences en fonction du phénotype. Les différences les plus caractéristiques ont été sélectionnées en éliminant les domaines où la variance intra-échantillon était grande, comme c'est le cas par exemple pour les bandes amide I et II. Les régions spectrales retenues sont rassemblées dans le tableau I.

1712-1712	1444-1440	1413-1409	1401-1397
1373-1369	1318-1314	1239-1235	1120-1116
1165-1161	1088-1084	1025-1021	

Tableau I : Régions spectrales ( $\text{cm}^{-1}$ ), sélectionnées pour réaliser l'ACP.

### 5.3 ACP sur les deux banques de spectres références

Une ACP a été réalisée sur les 17 spectres références *périphérie* ainsi que sur les 20 spectres *inoculum*, afin de s'assurer de la bonne séparation de ces deux populations de bactéries.

D'une manière générale, sur une carte ACP, un spectre est représenté par un point. Ainsi, la figure 6 représente la carte de distance de Mahalanobis.

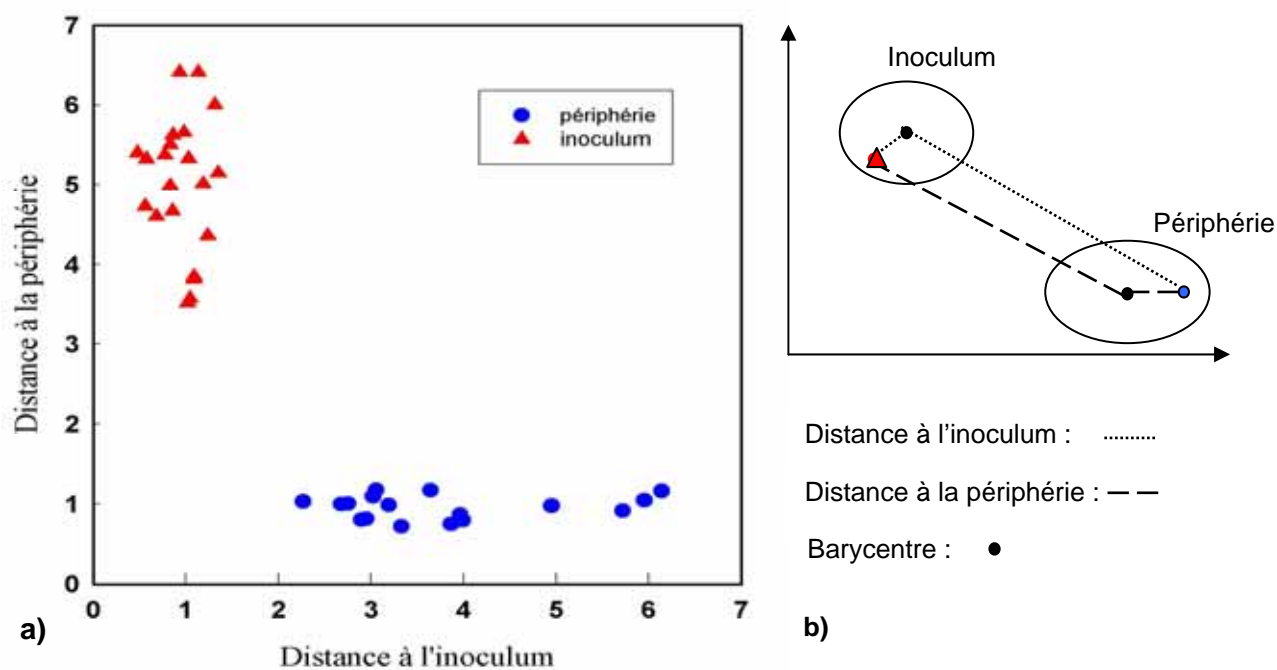


Fig. 6 : a) Carte de distance de Mahalanobis. b) Représentation schématique du calcul des distances.

La **distance à la périphérie** représente la distance entre un point correspondant à un spectre et le barycentre du nuage de points formé par l'ensemble des spectres de bactéries « périphéries ».

La **distance à l'inoculum** représente la distance entre un point correspondant à un spectre et le barycentre du nuage de points formé par l'ensemble des spectres de bactéries « inoculum ».

Cette carte traduit les différences spectrales entre les deux types de spectres formant les deux banques de référence. Par exemple, les points correspondant aux spectres de l'inoculum sont caractérisées par une faible valeur sur l'échelle « distance à l'inoculum » et une plus élevée sur l'échelle « distance à la périphérie ».

La carte de distance de Mahalanobis confirme que chaque phénotype (inoculum et périphérie), possède une signature spectrale caractéristique.

#### 5.4 Distribution spatiale des phénotypes

Les banques de données, constituées précédemment, vont permettre d'étudier la distribution spatiale des phénotypes au sein du biofilm formé par *Proteus mirabilis*.

Les études ont été réalisées sur six migrations. Les résultats présentés concernent trois expériences les plus représentatives dont les vitesses d'expansion radiales du biofilm étaient de l'ordre de 3 à 4 mm par heure. Les conditions d'acquisition sont celles décrites au paragraphe 4.

L'ACP a été effectuée à partir :

- des deux banques de spectres de bactéries *inoculum* et *périphéries*.
- des séries de spectres collectées au cours du développement du biofilm.

A partir des cartes ACP, nous avons calculé un indice de différenciation, défini par la relation V-1.

$$\text{Indice} = \frac{\text{Dist. Inoc}}{\text{Dist. Inoc} + \text{Dist. Périph}} \quad (\text{V-1})$$

Avec Dist. Inoc = distance à l'inoculum (Cf. Fig. 6)

Dist. Périph = distance à la périphérie (Cf. Fig. 6)

L'indice vaut donc 1 s'il s'agit du phénotype différencié (migrant) et 0 s'il s'agit du phénotype dédifférencié (végétatif).

Pour normaliser les résultats en fonction de la taille initiale du biofilm et du positionnement de la fibre, les distances de migration et la position de la sonde ont été exprimés de façon relative par un rapport au front par analogie aux méthodes chromatographiques. Ce rapport au front (Rf) a été calculé suivant la relation V-2.

$$\text{Rf}(t) = \frac{\text{Dist. « Inoc-fibre »}}{\text{Dist.}(t) \text{ « Inoc-front de migration »}} \quad (\text{V-2})$$

Avec : Dist. « Inoc-Fibre » = distance en mm entre le centre de l'inoculum et la fibre. Cette valeur est constante.

Dist.( t) « Inoc-Front de migration » = distance en mm entre le centre de l'inoculum et le front de migration, calculé pour chaque spectre, cette distance augmentant avec le temps.

Un rapport au front égal à 1 indique que le front de migration est arrivé au contact de la fibre. Les expériences ont été menées pour une durée correspondant au doublement du rayon (Rf=0,5), la sonde se trouve alors à mi distance de l'inoculum central et de la périphérie.

La figure 7 représente l'indice de différenciation en fonction du rapport au front.



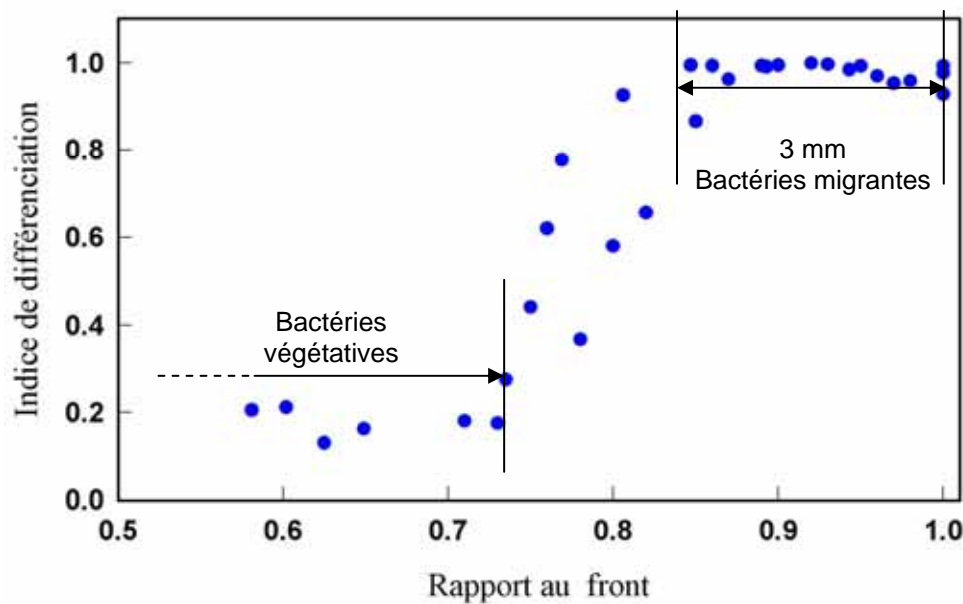


Fig. 7 : Evolution de l'indice de différenciation en fonction du rapport au front.

Avec un rayon initial de culture de 20 mm environ, la figure 7 indique que le phénotype différencié se situe uniquement sur quelques millimètres (environ 3 mm). Puis il existe une zone mixte, où les deux phénotypes sont présents (environ 4 mm). On retrouve ensuite un plateau correspondant au phénotype dédifférencié.

## 5.5 Discussion

L'Analyse en composantes principales permet de résoudre spectralement les deux phénotypes de *P. mirabilis* : migrant et végétatif. Grâce au système fibre, il a été possible de déterminer la répartition spatiale de ces deux phénotypes au sein du biofilm formé par *Proteus mirabilis* (Fig. 8), et ce, au cours du processus de migration, sur des cellules vivantes.

Contrairement à ce que laissait présumer les terrasses concentriques, le phénotype migrant n'alterne pas de façon continue avec celui des cellules végétatives puisqu'il n'est observé qu'au niveau du front de migration. Tout le reste du biofilm est constitué uniquement de bactéries végétatives. La durée des enregistrements est telle, que cela correspond à la formation de 2 à 3 terrasses. On peut donc affirmer que dans nos conditions expérimentales, il

ne se produit pas de re-différenciation cellulaire au niveau des zones internes du biofilm. Une analyse en microscopie optique a d'ailleurs montré que la mobilité bactérienne était d'autant plus réduite que l'on se rapprochait de l'inoculum.

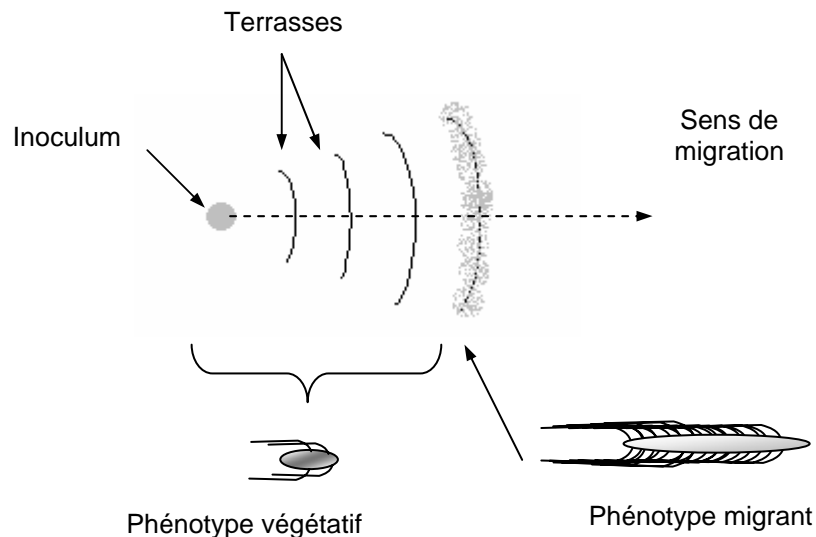


Fig. 8 : Cartographie des phénotypes de *Proteus mirabilis* lors du développement du biofilm.

## 6. Conclusion

Le biocapteur à base de fibre optique permet l'étude du développement d'un biofilm bactérien *in vivo*.

La sensibilité de la fibre optique permet non seulement de détecter l'arrivée des bactéries à son contact, mais également de suivre *in situ* et en temps réel, les modifications biochimiques survenant lors du processus de différenciation de *Proteus mirabilis*. Au cours de ce cycle, elle passe d'un phénotype migrant à un phénotype végétatif. Ces deux états possèdent chacun une signature spectrale caractéristique.

Ainsi, ces analyses ont permis de réaliser une cartographie des deux phénotypes au sein du biofilm formé par *Proteus mirabilis*.

Cette approche est inédite et ouvre une nouvelle voie d'analyse dans la compréhension et la détection de développement des biofilms bactériens.

## RÉFÉRENCES

- [1] W.A Jarret, J. Ribes, J.M. Manalogod, *Ear, nose & throat journal*, (2002), vol.81, n°9, 202, 659-661.
- [2] M. Chicurel, *Nature*, (2000), 408, 284-6.
- [3] C.M. Thien-Fah, A.G. O'Toole, *Trends in Microbiology*, (2001), 1 janvier, vol.9, n°1, 34-39
- [4] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Grennberg, *Science*, (1999), 284, 1318-22.
- [5] A. Filloux et I. Vallet, *Medecine/Sciences*, (2003), 19, 77-83.
- [6] J.W. Costerton, *Internatonal Journal of antimicrobial Agents*, (1999), 11, 217-221.
- [7] D. Gygi, M.M. Rahman, H.C. Lay, R. Carlson, J. Guard-Petter, C. Hughes, *Mol. Microbiol.*, (1995), 17, 1167-1175.
- [8] R.W. Brown, J. Baker, *Trends in Microbiology*, (1999), janvier, vol.7, n°1, 46-50.
- [9] O. Luderitz, M.A. Frudenberg, C. Galanos, V. Lehmann ; E.Th. Rietschel, D.H. Shaw, *Curr. Top. Membr. Transp.*, (1982), 17, 79-151.
- [10] E.Th. Rietschel, L. Brade, B. Lindner, U. Zahringer, *Biochemistry of lipopolysaccharides* In : D.C. Morison and J.L. Ryan (Eds.) *Bacterial endotoxic Lipopolysaccharides*, Vol. I : Molecular Biochemistry and Cellular Biology CRC, Boca Raton, FL, (1992), 3-41.
- [11] S.A. Makin, T.J. Beveridge, *Microbiology*, (1996) 142, 299-307.
- [12] C. Allison, L. Amodry, N. Coleman, C. Hughes, *J. Infect. Dis.*, (1994) May, 169 (5), 1155-8.
- [13] A. Rózalski, Z. Sidorczyk, K. Kotelko, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, (1992), 61, 65-89.
- [14] C. Allison, N. Coleman, PL. Jones, C. Hughes, *Infect. Immun.*, (1992), Nov., 60, (11), 4740-6.
- [15] M. Gué, V. Dupont, A. Dufour, O. Sire, *Biochemistry*, (2001), 40, 11938-11945.

- [16] J.M. Brass, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1986), 129, 1-92.
- [17] R.P.H. Huijbregts, A.I.P.M. de Kromm, B. de Kruijff, *Biochem. Biophys. Acta*, (2000), 1469 43-61.
- [18] G.M. Fraser, C. Hughes, *Curr. Opin. Microbiol.*, (1999), 2, 630-635.
- [19] C. Allison, C. Hughes, *Mol. Microbiol.*, (1991), 5, 1975-1982.
- [20] O. Rauprich, M. Matsushita, C.J. Weijer, F. Siegert, S.E. Esipov, J.A. Shapiro, *J. Bacteriol.*, (1996), 178, 6525-6838.
- [21] T. Matsuyama, Y. Takagi, Y. Nakagawa, H. Itoh, J. Wakita, M. Matsushita, *J. Bacteriol.* (2000), 182, 385-393.

**CONCLUSION**

**GÉNÉRALE**

## Conclusion générale

Les verres TAS de composition  $\text{Te}_2\text{As}_3\text{Se}_5$  permettent la synthèse de fibres ayant de faibles pertes optiques. Ces fibres, transparentes dans un large domaine du moyen infrarouge (MIR), ont permis d'envisager leur utilisation en spectroscopie IR.

En utilisant le principe de la spectroscopie par ondes évanescentes, il est possible, grâce à la fibre optique, de collecter des spectres IR. C'est ainsi que des analyses déportées ont pu être mises en œuvre, puisque c'est la fibre, de par sa flexibilité et sa capacité à transmettre le rayonnement IR à de longue distance, qui va venir au contact de l'échantillon. La mise en place d'une analyse est donc facile, car le conditionnement de l'échantillon est limité voir inexistant. De plus, les mesures sont rapides (1min./spectre) et peuvent être réalisées avec très peu de matériel. En réduisant le diamètre de la partie senseur, la sensibilité de ce capteur devient équivalente aux autres techniques plus classiques, d'acquisition de spectres MIR.

Ce système permet donc de capter de l'information *in situ*, ce qui se révèle particulièrement intéressant pour des études sur des systèmes biologiques. De par leur large fenêtre de transmission dans le MIR, les fibres optiques en verre TAS sont tout à fait adaptées à l'étude de molécules biologiques. Plus généralement, cette fenêtre spectrale permet l'étude de toutes les molécules organiques.

Les différentes analyses en biologie ont montré le potentiel de ce biocapteur quant à la détection et la caractérisation d'altérations du métabolisme protéique, glucidique et lipidique d'une cellule ou d'un fluide biologique. Les informations recueillies donnent une image métabolique globale et complète de l'échantillon analysé.

Cette technique d'analyse a tout d'abord été utilisée pour l'étude d'un tissu biologique. Le capteur à fibre optique en verre TAS a été testé sur un modèle animal : le foie de souris. L'étude des spectres montre des variations qui peuvent être reliées aux différents états métaboliques des cellules hépatiques. Ces altérations ont été mises en évidence à partir de

biopsies de foie séchées, mais aussi à partir de coupes de foies frais. Les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus par spectroscopie IR en transmission, et sont confirmés par des tests histo-chimiques. Les analyses réalisées la fibre en contact avec la capsule de Glisson, n'ont pas montré de différences spectrales du fait de l'épaisseur de cette capsule. Ceci souligne la difficulté de l'analyse d'organes qui sont recouverts, pour la plupart, d'un tissu conjonctif.

Un fluide biologique, le sérum, a été également analysé avec le système fibre. De même que pour l'analyse d'un tissu, ce système permet la détection de modifications du métabolisme en fonction d'un état pathologique ou physiologique particulier.

L'introduction d'un étalon interne, en concentration connue, dans le fluide à analyser permet de normaliser les spectres et ainsi d'envisager des études quantitatives. Le thiocyanate de potassium (KSCN) s'est révélé être un bon candidat, puisqu'il n'interagit pas avec les biomolécules et possède une raie unique en MIR, dans une région du spectre, où aucune des molécules d'intérêt n'absorbe. Son introduction permet de déterminer des variations de concentration des métabolites contenus dans le sérum. Les premiers résultats ont montré le potentiel de cette méthode pour des analyses quantitatives.

L'analyse en composantes principales (ACP) a permis de réaliser des études à partir de spectres de sérum humains sains et pathologiques. Les premiers résultats montrent la possibilité de distinguer les spectres en fonction d'une pathologie, malgré la forte hydratation des échantillons.

Ces travaux peuvent évidemment être étendus à toutes les pathologies affectant le contenu en métabolites du sérum.

Ce biocapteur offre également la possibilité de détecter une contamination et en outre, la possibilité de suivre l'évolution de cellules vivantes pendant un processus de différenciation. Cette technique permet, en effet, de suivre les modifications biochimiques au cours du temps, reliées à des phases critiques du développement biologique. De plus, cette technique est suffisamment sensible pour détecter, en temps réel, la colonisation d'un support par un biofilm bactérien. Cette étude démontre que des signatures IR distinctes permettent de résoudre spatialement et temporellement des changements métaboliques survenant dans des systèmes biologiques complexes.

La mise en forme du biocapteur n'est pas figée et peut être optimisée pour chaque application, ce qui en fait un outil d'investigation tout à fait innovant. Il est en effet possible, d'augmenter la flexibilité de la zone sensible de la fibre, en diminuant encore plus son diamètre. En conséquence, la courbure en « U » peut être diminuée jusqu'à un diamètre d'environ 5 mm. Dans ce cas, la surface de contact fibre/échantillon se retrouve diminuée. Cependant, ceci n'altère en rien la qualité du signal recueilli, puisque la sensibilité du senseur augmente quand le diamètre de la fibre diminue. De plus, un bon rapport signal/bruit étant obtenu sans exercer de pression sur la fibre, la résolution spatiale peut être de l'ordre du millimètre et le risque d'endommager le système est minime. Il est ainsi possible, par exemple, de réaliser plus finement de l'imagerie métabolique. Quant aux propriétés mécaniques des fibres, elles peuvent également être améliorées, en recouvrant notamment, la fibre d'une gaine vitreuse (fibre double indice) puis d'une gaine polymère. Ces travaux ont, d'ailleurs, fait l'objet d'une thèse au laboratoire Verres et Céramiques.

L'étendue des applications de ce type de biocapteur est telle que l'on ne peut imaginer leur intégration dans un système unique. Cette intégration ne peut se faire qu'au cas par cas, en fonction des besoins des professionnels de la santé, de l'alimentation, de l'environnement,...

Malgré cela, deux grands types de systèmes pour l'utilisation de ces biocapteurs peuvent être envisagés. Ils peuvent, tout d'abord, constituer un système de contrôle indépendant. Ils pourraient être, dans ce cas, utilisés en ligne pour du contrôle qualité en agro-alimentaire. En médecine, autre exemple, le biocapteur pourrait être utilisé en tant qu'aide au diagnostic rapide en cours d'opération ou tout simplement pour une analyse rapide du sang, urine (conséquences métabolique d'un dopage par exemple),...ou pour le contrôle de l'hygiène du matériel médical. On pourra alors imaginer des systèmes jetables.

Mais, on peut également envisager que les biocapteurs à fibres optiques fassent partie intégrante du système qui doit être contrôlé en continu. Ils pourraient être, par exemple, intégrés aux canalisations d'eau propre qui desservent les hôpitaux. De même, on peut imaginer, un capteur à fibre intégré dans un cathéter, ou bien sur des prothèses, permettant de contrôler constamment la présence ou non de micro-organismes. Pour ces applications, les systèmes devront être miniaturisés.



La liste des applications est tellement vaste que l'on ne peut se limiter ici qu'à ces quelques exemples. Le conditionnement du biocapteur à fibre optique dans un système fini et compact, pour ce type d'application, nécessitera à l'avenir l'implication d'autres savoir-faire tels que ceux des instrumentiers.

## **ANNEXE**

## ANNEXE

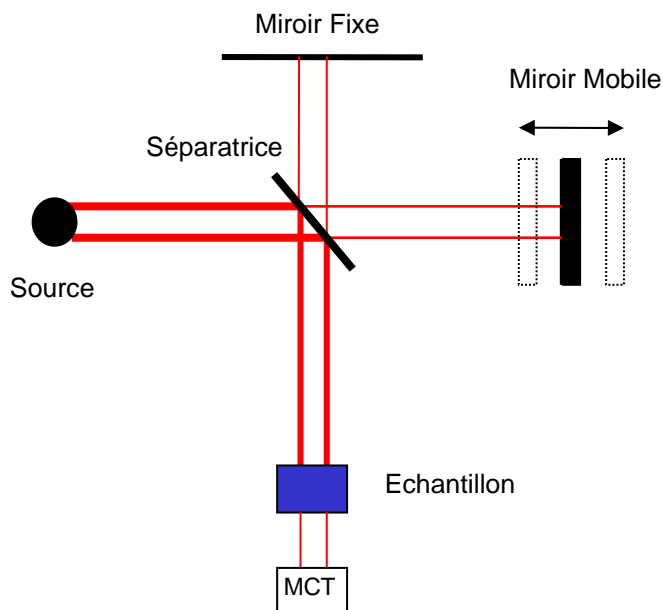
### Les spectromètres IR à transformée de Fourier

Actuellement, il existe trois types de spectromètres :

- Les appareils *séquentiels ou dispersifs*, qui enregistrent les uns après les autres les mesures spectrales aux différentes longueurs d'onde de la lumière.
- Les appareils *multiplexés*, le détecteur reçoit en même temps les informations provenant de plusieurs longueurs d'onde lumineuses. Dans ce cas, un système de codage des longueurs d'onde permet de reconstituer le spectre sous sa forme habituelle.
- Les systèmes *multicanaux*, dans lesquels plusieurs détecteurs photosensibles sont présents et enregistrent en parallèle, les rayons lumineux correspondant à plusieurs points de mesure.

Nous nous attacherons uniquement aux spectromètres IR de type multipléxé non dispersif, dont font partie les spectromètres à transformée de Fourier (IRTF). Ce type d'appareil est le plus répandu et c'est celui que nous avons utilisé pour nos mesures. Les IRTF sont apparus vers 1970. Ils réalisent une analyse simultanée de toutes les bandes spectrales à partir de mesures interférométriques. En effet, il s'agit d'un montage simple faisceau, basé sur l'emploi d'un interféromètre de Michelson (Fig.1) allié à un calculateur permettant d'obtenir le spectre (résolu en énergie) à partir de l'interférogramme (résolu en temps) enregistré par le détecteur.

Plus précisément, un corps noir est utilisé comme source de rayonnement. Ce faisceau vient frapper la lame séparatrice : une moitié du faisceau ira en direction du miroir fixe, l'autre, en direction du miroir mobile qui oscille au cours du temps entre deux positions extrêmes. En fonction de la position du miroir mobile, il se créent, lorsque les deux faisceaux se recombinent au niveau de la séparatrice, des interférences destructives ou constructives. Le signal ainsi modulé dans le temps, est focalisé sur le détecteur et constitue l'interférogramme. Sur le trajet du faisceau modulé, juste avant le détecteur, se trouve l'échantillon à analyser. Il absorbe à certaines longueurs d'onde, une partie de ce faisceau. Cela se traduira sur le spectre IR, par des bandes d'absorptions caractéristiques de l'échantillon analysé.



*Fig. 1 : Représentation schématique de l'interféromètre de Michelson.*

Grâce à une transformée de Fourier de l'interférogramme, on obtient le spectre IR simple faisceau, qui représente l'intensité transmise en fonction de la fréquence ou du nombre d'onde. Le spectre de transmission ou d'absorbance est ensuite calculé (paragraphe 1.1 et Fig. 2).

Le spectromètre IRTF que nous avons utilisé est équipé d'une source thermique (céramique métallique Glowbar). C'est sous l'effet de la chaleur que le corps noir va émettre de la lumière IR. La figure 3 montre la distribution de l'énergie de la source en fonction du nombre d'onde. La surface sous la courbe représente l'énergie émise pour toutes les longueurs d'onde.

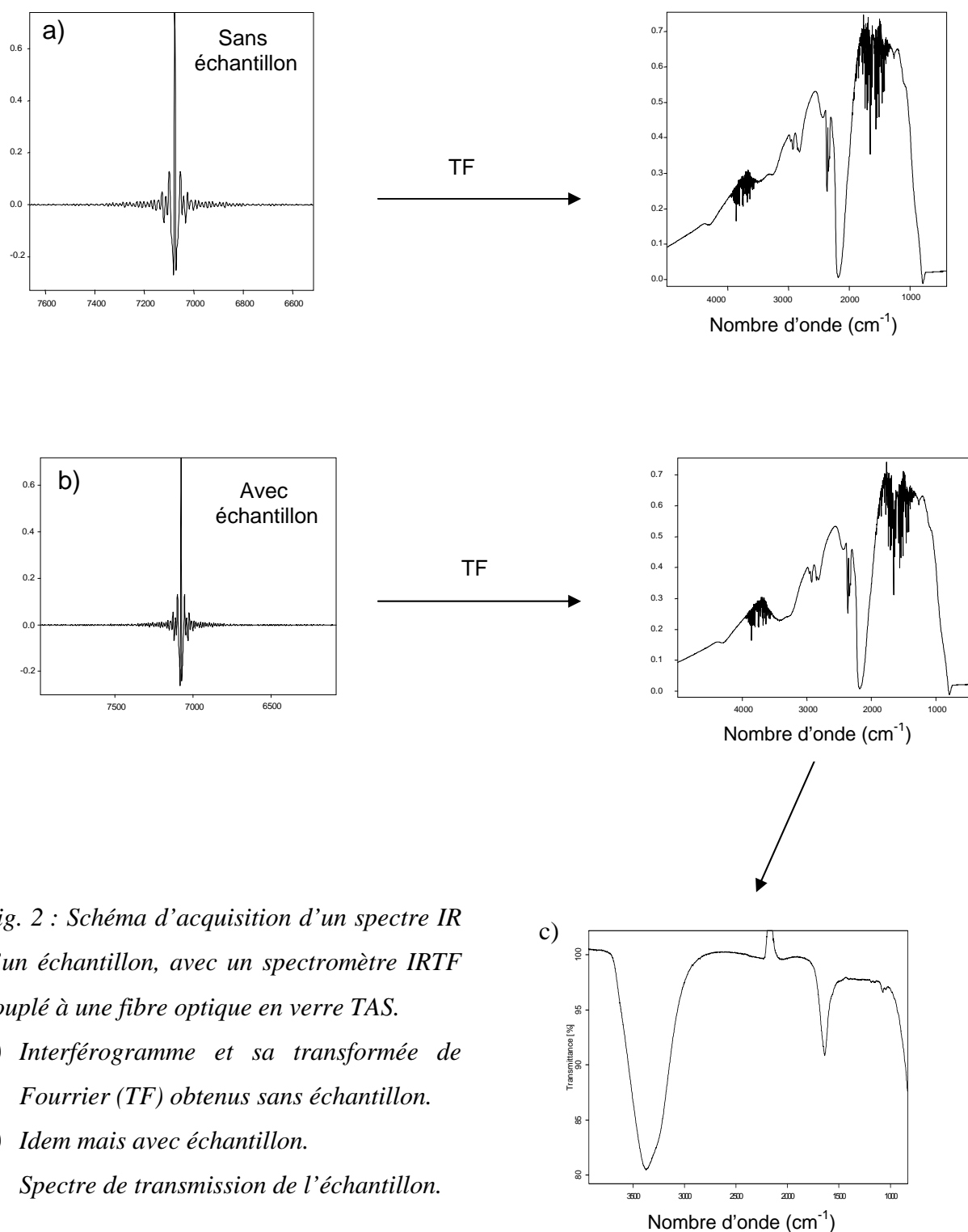
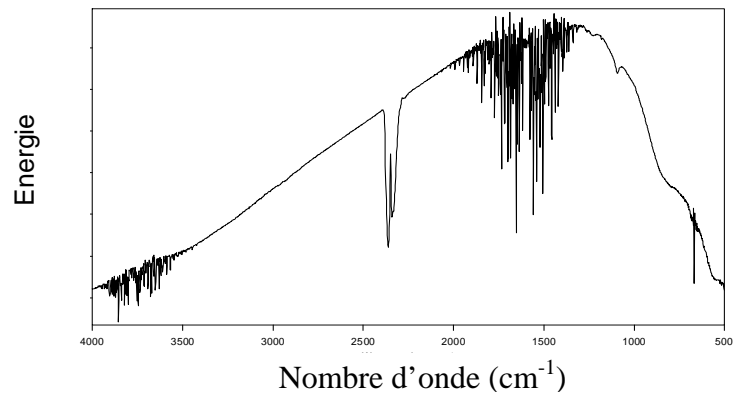


Fig. 2 : Schéma d'acquisition d'un spectre IR d'un échantillon, avec un spectromètre IRTF couplé à une fibre optique en verre TAS.

a) Interférogramme et sa transformée de Fourier (TF) obtenus sans échantillon.

b) Idem mais avec échantillon.

c) Spectre de transmission de l'échantillon.



*Fig. 3 : Distribution de l'intensité lumineuse émise par la source IR en fonction du nombre d'onde.*

Le détecteur intégré dans le spectromètre IRTF que nous avons utilisé, est de type Hg-Cd-Te (MCT). Il est constitué d'un alliage de mercure, cadmium et tellure déposé sur un support inerte. Sa sensibilité est améliorée lorsqu'il est refroidi à la température de l'azote liquide. Il s'agit d'un détecteur photovoltaïque, contenant une jonction  $p-n$  qui, sous l'effet du rayonnement, libère des électrons/trous qui font apparaître une différence de potentiel (ddp) mesurable dans un circuit ouvert.

## **PUBLICATIONS**

## PUBLICATIONS

### **Capteurs à Fibres Optiques Infrarouge dédiés à la détection *in situ* d'anomalies métaboliques**

*Journal de Physique VI*, France 12 (2002) Pr5-217

J. Keirsse, C. Boussard-Plédel, B. Bureau, O. Loreal, O. Sire, J. Lucas

### **Infrared glass fibers for, *in situ* sensing, chemical and biochemical reactions**

*C. R. Chimie* 5 (2002) 907-913

D. Lecoq, K. Michel, J. Keirsse, C. Boussard-Plédel, G. Fonteneau, B. Bureau, J.M. Le Quéré, O. Sire, J. Lucas

### **Infrared fiber sensors for applications in chemistry and biology**

Proc. SPIE "Photonic Glasses", 5061 (2003) 281-287.

B. Bureau, C. Boussard-Plédel, D. Lecoq, J. Keirsse, K. Michel, T. Jouan, J. Lucas

### **Chalcogenide Glass Fibres used as Biosensor**

*Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 326-327, 1 Oct. 2003, p. 430-433.

J. Keirsse, C. Boussard-Plédel, O. Loreal, O. Sire, B. Bureau, B. Turlin, P. Leroyer, J. Lucas

### **IR Optical Fibre Sensor for Biomedical Applications**

*Vibrational Spectroscopy*, Vol. 32, Issue I, 5 August 2003, p. 23-32.

J. Keirsse, C. Boussard-Plédel, O. Loreal, O. Sire, B. Bureau, B. Turlin, P. Leroyer, J. Lucas

### **Metabolic Imaging of Tissues by infrared fibre-optics spectroscopy : An efficient tool for medical diagnosis**

*Journal of Biomedical Optics* 09(02), Mars 2004, p. 404-407, Bruce J. Tromberg; Ed

S. Hocdé, O. Loréal, O. Sire, C. Boussard-Plédel, B. Bureau, B. Turlin, J. Keirsse, P. Leroyer, J. Lucas.



## ABSTRACT

An optical chalcogenide fibre biosensor operating in the Mid-Infrared (MIR) has been developed. It enables to collect infra-Red (IR) spectra by remote spectroscopy thanks to the fibre. The principle of measurement is based on the general concept of Fibre Evanescent Wave spectroscopy. To improve the detection of such a sensor, a tapered fibre is necessary. The transportation section diameter is 450  $\mu\text{m}$ , and 100  $\mu\text{m}$  in the sensing zone, it is this part of the fibre which will be brought into contact with the sample to analyse.

Metabolic states of a biological tissue and fluid have been characterised. Samples, mouse livers and serums, are put into contact with the fibre and MIR spectra are collected. The aim is to identify two different metabolic states (pathogenic one and normal) of a same sample. Spectral differences have been identified and assigned to metabolic alterations of glucids, lipids and/or proteins. These differences consist in an increase of the absorption bands intensity and/or shift of characteristic bands. In any case, all spectral results are in agreement with histologic staining and dosages of the sample.

The second topic concerns the non-invasive and *in situ* monitoring of the dynamics of bacterial biofilm. The model used is an uropathogenic micro-organism, called *Proteus mirabilis*, which exhibits a strong swarming abilities. This bacteria has developed a complex multi-cellular behaviour correlated in space and in time, which permits itself to colonise new surfaces. The change from a vegetative to a differentiated state (pathogenic one) is accompanied by important biochemical modifications in the bacteria membrane. MIR spectra, collected during the *P. mirabilis* biofilm development, allow to detect in real time a surface contamination thanks to the fibre, but also biochemical modifications of the bacteria membrane constituents.

All spectra have been analysed by Principal Component Analysis (PCA) method to classify spectra by metabolic state but also to determine the spatial cartography of *P. mirabilis* phenotype.

**KEY WORDS :** Optical Fibre, Evanescent Wave, FTIR, Biologic Fluid, Biologic Tissue, Bacteria Biofilm, Metabolism, PCA.

## RÉSUMÉ

Un biocapteur à base de fibre optique en verre de chalcogénures, transparente dans un large domaine du moyen infrarouge (MIR), a été développé. Il permet l'enregistrement de spectres MIR par spectroscopie déportée. Le principe de la mesure est basé sur le concept de la spectroscopie par ondes évanescentes. Pour améliorer la sensibilité, les fibres utilisées sont effilées sur quelques centimètres et ont un profil en diamètre de 450-100-450  $\mu\text{m}$ . La zone effilée sera mise en contact avec l'échantillon à analyser.

Différents états métaboliques (physiologique ou pathologique) dans le foie et le sérum ont été analysés. Les coupes de foies et les sérums ont été mis directement en contact avec la partie senseur de la fibre, et des spectres MIR ont ainsi été collectés. L'objectif de ces études est d'identifier deux états métaboliques différents (sain et pathologique) d'un même échantillon. Des modifications spectrales peuvent être mises en évidence et reliées à une ou des altération(s) du métabolisme des lipides, glucides et/ou protides. Ces modifications peuvent être des différences d'intensité et/ou des décalages en nombre d'onde de bandes d'absorption. Tous les résultats sont corrélés avec les dosages sanguins et les colorations histologiques des échantillons analysés.

Le développement d'un biofilm bactérien a été suivi *in situ* et en temps réel. *Proteus mirabilis* est un micro-organisme pathogène, opportuniste des voies urinaires, qui a développé un comportement multi-cellulaires complexe, corrélé dans l'espace et le temps, ce qui lui permet de coloniser de nouvelles surfaces. Durant le processus de différenciation, le changement de l'état végétatif à celui migrant (pathogène) est accompagné par des modifications des constituants membranaires. Les spectres MIR, enregistrés pendant le développement d'un biofilm à *P. mirabilis*, permettent de détecter en temps réel une contamination de surface, mais aussi les modifications biochimiques des constituants de la membrane bactérienne.

Tous les spectres ont été traités par Analyse en Composantes Principales (ACP), d'une part pour une reconnaissance non-supervisée d'une pathologie, et d'autre part, déterminer la distribution spatiale des phénotypes de *P. mirabilis* au sein du biofilm

**MOTS CLEFS :** Fibres Optiques, Ondes Evanescentes, Spectroscopie IR, Métabolisme, Tissu, Fluide Biologique, Biofilm, Analyse en Composantes principales.